SYNTHESE UND KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN VON POLYÄTHYLENGLYKOL-GEBUNDENEN OLIGOPEPTIDEN UND ACTH-SEQUENZEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hildegard Mutter
aus Basel

1978

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0030

SYNTHESE UND KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN VON POLYÄTHYLENGLYKOL-GEBUNDENEN OLIGOPEPTIDEN UND ACTH-SEQUENZEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hildegard Mutter
aus Basel

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	6. Dezember 1977
Dekan	Prof. Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter	Prof. Dr. W. Voelter

Meinem Vater in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer in der Zeit von November 1973 bis Juni 1977 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und unter zeitweiliger Betreuung von Prof. Dr. P.J. Flory am Department of Chemistry an der Stanford University, USA, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer danke ich herzlich für sein stetes Interesse und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P.J. Flory danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme und die intensive Betreuung bei der Bearbeitung des theoretischen Teils.

Herrn Dozent Dr. Manfred Mutter danke ich für grundlegende Diskussionen und viele wertvolle Anregungen.

Frl. Jeanine Brun danke ich sehr herzlich für ihre große Sorgfalt bei der Aufnahme der vielen CD-Spektren.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
II.	PEPTIDSYNTHESEN NACH DER LIQUID-PHASE-METHODE (LPM)	4
1.	Allgemeines zur Synthese von Peptiden	4
2.	Die Liquid-Phase-Methode (LPM)	7
3.	Methodische Grundlagen der LPM	10
3.1.	Die Bestimmung der Hydroxylzahl	10
3.1.1.	Allgemeines	10
3.1.2.	Spektroskopische Ermittlung der Hydroxylzahl	13
3.1.3.	Beispiele	15
3.2.	Veresterungsversuche an PEG	16
3.3.	Zwischenfällungen bei der Peptidkupplung	18
3.4.	Kristallisation von PEG-Peptiden	20
4.	Oligopeptide	21
4.1.	Spezielle Aspekte	21
4.2.	Oligo-L-Alanin	24
4.3.	Oligo-L-Valin	26
4.4.	Oligo-L-Isoleucin	28
4.5.	Diskussion	29
5.	ACTH-Sequenzen	31
5.1.	Allgemeines	31
5.2.	Synthesestrategie	34
5.3.	Syntheseverlauf und Diskussion	36
5.3.1.	α^{11-23}-ACTH	36
5.3.2.	Val^4-α^{1-10}-ACTH, (Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4)-α^{1-10}-ACTH	38

III.	KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN	42
1.	Allgemeines zur Konformation von Peptiden	42
2.	Konformationsanalyse PEG-gebundener Peptide	47
2.1.	Voraussetzungen	47
2.2.	Einfluß der PEG-Kette auf die Konformation des Peptids	51
3.	Ergebnisse und Diskussion der Konformationsuntersuchungen	54
3.1.	Oligopeptide	54
3.1.1.	CD-Untersuchungen	54
3.1.2.	^{1}H-NMR-Studien	67
3.1.3.	Untersuchungen an PEG-Oligopeptiden im Festzustand	70
3.1.4.	Schlußbetrachtung	73
3.2.	ACTH-Sequenzen	74
3.2.1.	Bisheriges Wissen über die Konformation von ACTH	74
3.2.2.	Ergebnisse	75
4.	Vorhersagen der Konformation durch Konformationsberechnungen	83
4.1.	Allgemeines zu Konformationsberechnungen	83
4.2.	Grundlagen der Vorhersageschemata	89
4.2.1.	Chou-Fasman-Methode	89
4.2.2.	Tanaka-Scheraga-Methode	94
4.3.	Ergebnisse der Vorhersagen	100
4.3.1.	Oligopeptide	100
4.3.2.	ACTH-Sequenzen	101
5.	Diskussion der Konformationsuntersuchungen	109
6.	Schlußfolgerung	115

IV.	BERECHNUNGEN ZU DISTANZMESSUNGEN DURCH FLUORESZENZ-EMISSIONSSPEKTROSKOPIE	117
1.	Allgemeines zur Methode	117
2.	Berechnungen zum Orientierungsfaktor $\langle \varkappa^2 \rangle$	120
2.1.	Grundlagen der Berechnung	120
2.2.	Ergebnisse und Diskussion	127
2.3.	Der Einfluß von $\langle \varkappa^2 \rangle$ auf Distanzbestimmungen	134
2.4.	Schlußfolgerung	137
V.	EXPERIMENTELLER TEIL	139
1.	Allgemeine Verfahren	139
1.1.	Geräte und Materialien	139
1.2.	Reinigung der Lösungsmittel	140
1.3.	Synthese von BOC-Aminosäuren	141
1.4.	Synthese trifunktioneller Aminosäure-derivate	142
1.5.	Produktcharakterisierung	145
2.	Spezielle Methoden	147
2.1.	Durchführung des Fluramtestes zur Umsatzbestimmung	147
2.2.	Bestimmung der Hydroxylgruppenkapazität bzw. Hydroxylzahl von PEG	147
2.2.1.	Synthese der Urethanmodellverbindungen	147
2.2.2.	Umsetzung zum PEG-Urethan und Bestimmung der Hydroxylgruppenkapazität	149
3.	Veresterung von PEG	150
4.	Darstellung der Oligopeptide	152
4.1.	Oligo-L-Alanin	152
4.2.	Oligo-L-Valin	154
4.3.	Oligo-L-Isoleucin	156
5.	Darstellung der ACTH-Sequenzen	158
5.1.	α^{11-23}-ACTH	158
5.2.	Val^4- α^{1-10}-ACTH, $(Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4)$-$\alpha^{1-10}$-ACTH	162

VI. ZUSAMMENFASSUNG 167

VII. LITERATURVERZEICHNIS 170

In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

Ac-	Acetyl-
AcOH	Eisessig
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
As	Aminosäure
BOC-	tert.-Butyloxycarbonyl-
Bzl-	Benzyl-
CD	Zirkulardichroismus
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	Dicyclohexylharnstoff
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
d.Th.	der Theorie
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure-Na-Salz
EtOH	Äthanol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
IR	Infrarot
LPM	Liquid-Phase-Methode
MeOH	Methanol
NMR	Kernmagnetische Resonanz
PEG	Polyäthylenglykol
RT	Raumtemperatur
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluoräthanol
Z-	Benzyloxycarbonyl

Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen den IUPAC-Regeln

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Durch den engen Zusammenhang zwischen Konformation und biologischer Aktivität von Peptiden hat die Synthese dieser Substanzklasse stark an Bedeutung gewonnen:

Die systematische Variation der Primärstruktur eines Peptids und deren Einfluß auf die Konformation und biologische Aktivität ermöglicht es, einen Einblick in die Struktur-aktivitätsbeziehung zu gewinnen, wodurch Wirkungsmechanismen biologisch wichtiger Moleküle aufgeklärt werden können.

Da im allgemeinen die biologische Aktivität eines Peptids bei Zerstörung der dreidimensionalen Struktur - der nativen Konformation - verloren geht und sich unter geeigneten Bedingungen wiederherstellen läßt, geht man bei Untersuchungen über die Konformation von Peptiden und Proteinen heute von der Arbeitshypothese aus, daß die gesamte Information zur Erlangung der nativen Konformation - und damit der biologischen Aktivität - in der Aufeinanderfolge der einzelnen Aminosäurereste - der sogenannten Primärstruktur - enthalten ist (1-3). Der Zusammenhang zwischen Primärstruktur und Konformation - der sog. Tertiärstruktur eines Peptids - ist somit stark in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Dabei werden im wesentlichen zwei Wege verfolgt:

1. Es werden Modellpeptide synthetisiert, deren Primärsesequenz in systematischer Weise verändert wird. Der Einfluß einzelner Aminosäurereste bzw. ganzer Peptidsequenzen auf die Konformation wird durch spektroskopische Untersuchungen - z.B. CD-, NMR-, IR- oder Raman-Spektroskopie - unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ermittelt (4-6).
2. Durch theoretische Berechnungen wird versucht, die konformationsbildenden Kräfte innerhalb eines Peptids quantitativ zu erfassen mit dem Ziel, anhand einer gegebenen

Primärstruktur Vorhersagen über die dreidimensionale Struktur des Moleküls zu machen (7-10).

Es hat sich inzwischen gezeigt, daß keiner der beiden Wege direkt zum Ziel führt: Die Fähigkeit von Proteinen, aus einer unendlichen Zahl von möglichen Konformationen selbst nach Zerstörung jeglicher Ordnung die einzigartige, native Konformation wieder einzunehmen, bleibt somit auch heute noch weitgehend unverstanden. Wegen der Komplexität des Problems ist man dazu übergegangen, relativ kurzkettige Peptideinheiten als Modelle für große Peptidverbände zu studieren. Dabei hat sich ein enges Zusammenspiel zwischen experimenteller und theoretischer Information als sehr nützlich erwiesen. Bei diesen Untersuchungen geht man von der Annahme aus, daß die konformationsbildenden Kräfte im wesentlichen von den Eigenschaften der einzelnen Aminosäurereste abhängen, also von Wechselwirkungen über relativ kurze Distanzen der Peptidkette, sodaß die gewonnenen Erkenntnisse auf größere Verbände übertragbar sind (2, 11-13). Selbst das Studium relativ kurzer Pepitdketten ist vielen Beschränkungen unterworfen:

1. Die Synthese von Peptiden stellt trotz der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Strategien bis heute ein noch nicht befriedigend gelöstes Problem dar.
2. Für Konformationsuntersuchungen besonders interessante Peptide besitzen häufig ungünstige Löslichkeitseigenschaften und sind somit dem Studium der Konformation in Lösung nur schwer zugänglich.
3. Die rein theoretische Behandlung - z.B. die Berechnung von Konformationsenergien - wird wegen der Vielzahl von variablen Rotationswinkeln aufwendig.
4. Die experimentellen Methoden zur Konformationsuntersuchung liefern im allgemeinen keinen direkten Einblick in die stereochemischen Verhältnisse eines Peptids und Endgruppeneffekte - besonders bei kurzen Peptiden relevant - führen häufig zu schwer interpretierbaren Ergebnissen.

Auf dem Hintergrund dieser Probleme setzen die Überlegungen ein, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen:

Zunächst soll untersucht werden, ob die Liquid-Phase-Methode zur Peptidsynthese (14-17) einen Beitrag leisten kann zur Lösung der oben genannten präparativen Schwierigkeiten. Insbesondere wird untersucht, ob die dabei verwendete makromolekulare C-terminale Schutzgruppe, PEG, auch hydrophobe Peptidsequenzen zu solubilisieren vermag und inwieweit die Konformation des Peptids durch die Anwesenheit dieser Schutzgruppe beeinflußt wird. Hierzu eignen sich vor allem Oligopeptide mit ausgeprägter Tendenz zu geordneten dreidimensionalen Strukturen.

Am Beispiel von ACTH-Sequenzen, über deren Konformation bis heute wenig bekannt ist, werden die in jüngster Zeit vorgeschlagenen Konformationsvorhersagemethoden (sog. "prediction codes") zur Erstellung eines Modells für die Konformation von ACTH herangezogen. Hierbei wird die von Chou und Fasman eingeführte Methode zur Vorhersage von Strukturelementen (18-20) verglichen und der neuentwickelten statistisch-mechanischen Behandlung von Tanaka und Scheraga (21-24), die somit erstmals auf ACTH angewendet wird. Durch Synthese und Konformationsuntersuchungen soll geprüft werden, ob sich die von der Theorie vorhergesagten konformationellen Merkmale bzw. Strukturen experimentell bestätigen lassen.

II. PEPTIDSYNTHESEN NACH DER LIQUID-PHASE METHODE

1. Allgemeines zur Synthese von Peptiden

Bis heute gibt es kein Standardverfahren, nach dem Peptide mit beliebiger Sequenz und Kettenlänge synthetisiert werden können. Vielmehr gilt es, für das jeweils ins Auge gefaßte Syntheseproblem die richtige Strategie in Bezug auf Schutzgruppen und Aufbauverfahren zu finden. Dazu steht eine Reihe, von der Konzeption her sehr unterschiedlicher Synthesevarianten zur Verfügung, die sich in drei Gruppen einteilen lassen:

Strategie I, die konventionelle Synthese, baut unter weitgehender Maskierung der Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren zunächst größere Peptidteilstücke auf, die anschließend zur Gesamtsequenz des Peptids verknüpft werden. Das Peptid wird in jeder Stufe isoliert und durch Kristallisation gereinigt, sodaß einheitliche Produkte erhalten werden (25-29).

Strategie II, die Festkörpersynthese (30-35), bei der die wachsende Peptidkette über die C-terminale Aminosäure an einem unlöslichen Träger, i.allg. quervernetztes Polystyrol, fixiert wird und das Peptid stufenweise ohne Isolierung von Zwischenprodukten aufgebaut wird. Der von der Strategie verlangte quantitative Umsatz in jeder Stufe wird durch Verwendung großer Überschüsse an aktivierter Carboxylkomponente zu erreichen versucht.

Strategie III, die Synthese mit Hilfe löslicher polymerer Träger (36-39), die prinzipiell das gleiche Aufbauprinzip wie Strategie II besitzt. Hier werden alle Reaktionen in Lösung durchgeführt und das polymergebundene Peptid in jeder Stufe durch Kristallisation isoliert (17, 36).

Neben diesen Verfahren sind eine Reihe weiterer interessanter Synthesevarianten vorgeschlagen worden. Dabei haben vor allem die Polymer-Reagenz-Methode von Katchalski (40),

die sog. "Letsinger-Methode" und die "Tilak-Methode" (41, 42) einige Bedeutung erlangt. Eine Kombination der Strategie II und III stellt die in jüngster Zeit von Hagenmaier und Frank entwickelte alternierende Liquid-Solid-Phase-Methode dar, bei der jedoch - im Gegensatz zu bisherigen Trägersynthesen - ein quantitativer Umsatz in jedem Kupplungsschritt nicht erforderlich ist (43-45). Über die von Jung und Mitarbeitern vorgeschlagene Kombination der Polymer-Reagenzmethode mit Strategie III liegt noch wenig Erfahrung vor (46); ein möglicher Vorteil dieser Strategie liegt in der Einfachheit des Synthesezyklus, jedoch bleibt abzuwarten, ob die Kinetik bei dieser Polymer-Polymer-Reaktion den Anforderungen einer Trägersynthese genügt.

Eine kritische Gegenüberstellung der verschiedenen Strategien ergibt folgendes Bild: Strategie I liefert zwar nebenproduktfreie Peptide, wird aber von der Löslichkeit der Peptidfragmente her begrenzt (27). Das Verfahren erfordert viel präparative Erfahrung und ist zeitlich aufwendig. Strategie II überwindet das Löslichkeitsproblem und ist konzeptionell sehr einfach, besitzt aber methodische Nachteile; wegen der heterogenen Reaktionsbedingungen verlaufen die Kupplungsreaktionen häufig nicht quantitativ, wodurch Rumpf- und Fehlsequenzen entstehen (47-50,52-54). Da somit nur schwer trennbare Peptidgemische erhalten werden, ist diese an und für sich elegante Methode auf die Synthese kleiner bis mittlerer Peptidketten beschränkt. Strategie III versucht, die durch die polymere feste Matrix verursachten Schwierigkeiten der Festkörpersynthese durch die Verwendung löslicher Polymere zu umgehen. Tatsächlich hat sich gezeigt, daß bei Verwendung geeigneter polymerer Träger homogene Reaktionsbedingungen vorherrschen, sodaß eine quantitative Kupplungsreaktion grundsätzlich erzielt werden kann (56, 57). Der stufenweise Aufbau eines Peptids

kann solange fortgesetzt werden, wie die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Polymerpeptids vom polymeren Anteil bestimmt werden (37). Diese Grenze sollte beträchtlich über derjenigen der klassischen Synthese liegen.

Welches Syntheseverfahren sich nun tatsächlich am besten eignet, hängt vom jeweiligen Syntheseproblem ab. Zum Aufbau biologisch aktiver, pharmazeutisch verwendbarer Peptide erscheint das klassische Verfahren nach wie vor im Vorteil zu sein, da in diesen Fällen der Zeitfaktor eine unwesentliche Rolle spielt und die Strategie maximale Flexibilität in Bezug auf Schutzgruppen und Kupplungsmethoden zuläßt (27, 58-63).

Zur Synthese von Modellpeptiden, Peptidanalogen oder Oligopeptiden, wie sie im Zusammenhang mit Konformationsuntersuchungen (z.B. zum Studium der Aktivitäts-Struktur-Beziehung) gebraucht werden, besitzen die Trägersynthesen eindeutige Vorteile. Durch den rationellen stufenweisen Aufbau gelingt es, Zusammenhänge zwischen Primärstruktur und Konformation eines Peptids systematisch zu erforschen. Gesichtspunkte wie Ausbeuten oder Charakterisierung von Zwischenprodukten spielen hier eine untergeordnete Rolle. Die Liquid-Phase-Methode bietet hier einen besonderen Vorteil: durch den solubilisierenden Einfluß der polymeren Schutzgruppe auf das Peptid können auch schwerlösliche Peptide erstmals ohne besonderen präparativen Aufwand der Konformationsanalyse zugänglich gemacht werden.

Die direkte Untersuchung polymergebundener Peptide eröffnet somit eine Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen Primärstruktur, Kettenlänge, Lösungsmittel und Schutzgruppen systematisch zu untersuchen. Diese neue Anwendung der Liquid-Phase-Methode wird in dieser Arbeit anhand mehrerer Beispiele demonstriert, wobei der Rolle der makromolekularen Schutzgruppe besondere Beachtung geschenkt wird.

2. Die Liquid-Phase-Methode (LPM)

Bei der LPM wird das aufzubauende Peptid über die C-terminale Aminosäure an einen polymeren, löslichen Träger fixiert. Der Synthesezyklus wird von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der makromolekularen Schutzgruppe bestimmt. Der polymere Träger hat folgende Funktionen:

- Er dient als C-terminale Esterschutzgruppe in Analogie zum klassischen Verfahren.
- Er übt einen solubilisierenden Einfluß auf die Peptidkette aus, sodaß alle Syntheseschritte in Lösung durchgeführt werden können.
- Er verleiht dem Peptid vom Beginn der Synthese an Eigenschaften, die eine einfache und quantitative Abtrennung der niedermolekularen, im Überschuß eingesetzten Reagenzien ermöglichen.

Von der großen Zahl der inzwischen für diesen Zweck untersuchten löslichen Polymeren (16, 64-66) hat sich Polyäthylenglycol (PEG) mit der allgemeinen Formel $HO(CH_2CH_2O)_nH$ am besten bewährt. PEG kristallisiert als 7_2-Helix (7 Monomereinheiten pro 2 Kettenumdrehungen) mit einer Identitätsperiode von 19.3 Å (Abb. 1).

Abb. 1: Kristallstruktur von PEG nach Tadokoro et al. (67)

Einerseits erfüllt PEG die oben angegebenen Aufgaben eines polymeren Trägers dank seiner äußerst günstigen Löslichkeits- (68) und Kristallisationseigenschaften in hohem Maße, andererseits werden wegen der günstigen Anordnung der funktionellen Gruppen sterische Behinderungen, wie sie bei polyfunktionellen Trägern auftreten (39, 66), vermieden. Die chemische Äquivalenz der beiden funktionellen Gruppen führt zu einem linearen Verlauf der Kinetik bei der Kupplungsreaktion (56). Diese für einen quantitativen Umsatz essentielle Voraussetzung scheint bei statistischer Verteilung der funktionellen Gruppen nicht erfüllt zu sein (69-71); kinetische Studien von Rink und Andreatta ergaben starke Abweichungen von der linearen Kinetik bei polyfunktionellem Polystyrol (39). Vergleichende kinetische Untersuchungen führten zu dem von der Theorie vorhergesagten Befund (53, 72), daß sich die Reaktionsgeschwindigkeiten von niedermolekularen und hochmolekularen (PEG-) Peptidestern nicht signifikant unterscheiden (56). Das von Flory postulierte Prinzip (72), daß sich die Reaktivität einer funktionellen Gruppe nach der Fixierung an ein Polymer nicht verändern sollte, konnte somit eindrucksvoll bestätigt werden. Die bei der Festkörpermethode gefundenen Abweichungen sind vor allem auf sterische Faktoren der unlöslichen Matrix zurückzuführen (53).

Für die praktische Durchführung des Synthesezyklus ist neben der guten Löslichkeit des PEG in allen zur Peptidsynthese üblicherweise verwendeten Lösungsmittelm die für Polymere ungewöhnlich hohe Kristallisationsneigung von PEG bedeutend (37, 67, 73, 74). Dadurch wird die Gefahr von Einschlüssen niedermolekularer Verbindungen, wie sie bei amorph anfallenden polymeren Verbindungen (z.B. Shemyakin's Polystyrol (38)) gegeben ist, stark reduziert. Systematische röntgenographische Untersuchungen an Oligo-[L-Ala]-PEG-estern (siehe Kap. 4.2.) haben gezeigt, daß der hohe Kristallisationsgrad des PEG auch nach Fixierung einer Peptidkette an die beiden endständigen OH-Gruppen weitgehend erhalten bleibt. Die Kristalli-

sierbarkeit von PEG-Peptiden ist vor allem bei den in dieser Arbeit durchgeführten Oligomersynthesen hydrophober Peptide von Bedeutung, da die ungünstigen Löslichkeitseigenschaften dieser Oligomere überwunden werden können, und die Peptidester in gut filtrierbarer Form anfallen.
Der Synthesezyklus besteht somit aus folgenden Schritten:

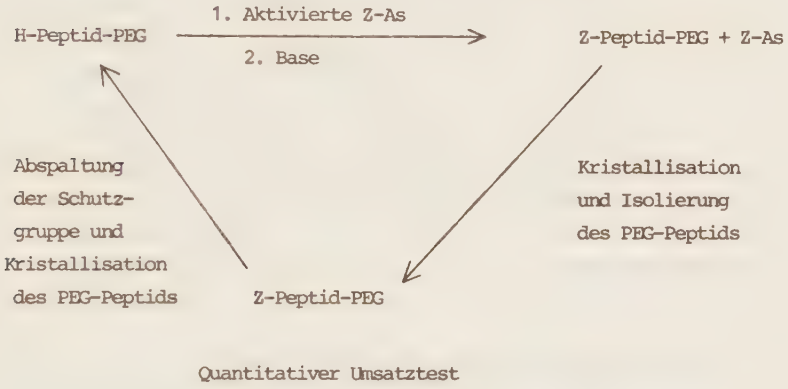


Abb. 2: Synthesezyklus des Kristallisationsverfahrens nach der Liquid-Phase-Methode (17).

Ein standardisierter Syntheseablauf läßt sich nur hinsichtlich der Schutzgruppenabspaltung und der analytischen Kontrollen des Syntheseverlaufs allgemein angeben. Durch die unterschiedlichen Kupplungsraten und die sequenzspezifische Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der PEG-Peptide bei wachsender Kettenlänge, vor allem des Löslichkeitsverhaltens, müssen die optimalen Reaktionsbedingungen für jedes Syntheseproblem ermittelt werden. Die Reproduzierbarkeit des Syntheseverlaufs infolge der homogenen Reaktionsbedingungen läßt eine Automation der Synthese prinzipiell zu (75, 76).

In diesem Kapitel werden zunächst die im Zuge der durchgeführten Peptidsynthesen neu entwickelten Grundlagen bzw. präparativen Neuerungen dieses relativ jungen Syntheseverfahrens dargelegt. Anschließend wird auf die spezielle Problematik bei der Synthese hydrophober Oligopeptide eingegangen: Es wird aufgezeigt bis zu welcher Kettenlänge, die solubilisierende Wirkung der PEG-Kette auf das Peptid in ausreichendem Maße erhalten bleibt. Fragen nach den Grenzen des stufenweisen Kettenaufbaus von Peptiden an löslichen Trägern werden diskutiert. Die experimentellen Bedingungen, wie sie üblicherweise bei Synthesen sequentieller Peptide - z.B. bei ACTH-Sequenzen, siehe Kap.5 - gewählt werden, sind erheblich modifiziert worden, um die, z. Teil erstmals synthetisierten, Oligomere präparativ zugänglich zu machen. Die mit den Konformationsuntersuchungen zusammenhängenden Aspekte der Verwendung polymerer löslicher Träger werden in Kapitel 5 behandelt.

3. Methodische Grundlagen der LPM

3.1. Die Bestimmung der Hydroxylzahl

3.1.1. Allgemeines

Das bis heute praktisch ausschließlich in der LPM verwendete PEG wird durch anionische Polymerisation von Äthylenoxid hergestellt (68). Durch die kontrollierte Polymerisation wird ein linear aufgebautes Kettenmolekül mit zwei endständigen Hydroxylgruppen erhalten. Die Molekulargewichtsverteilung errechnet sich nach Flory (77) aus der Poisson'schen Formel (Abb. 3).

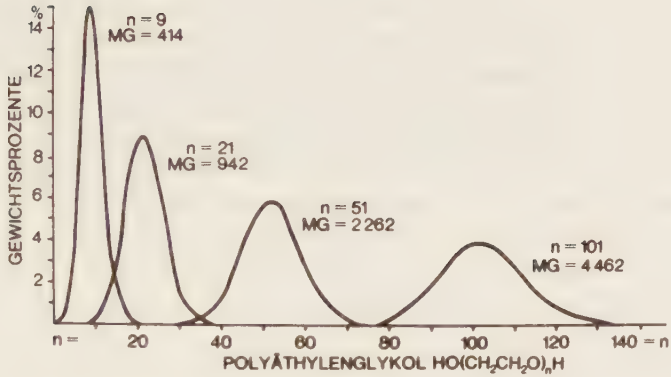


Abb. 3: Molekulargewichtsverteilung der PEG 400 - 4000

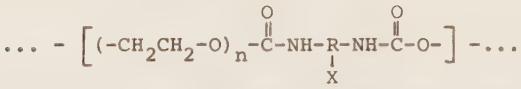
Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß die Streuung des Molekulargewichts in den zur Synthese verwendeten Molekulargewichtsbereichen von PEG (Polymerisationsgrad >100) sehr beträchtlich ist. Die käuflichen Polymere werden durch fraktionierte Fällung in verschiedene Molekulargewichtsbereiche eingeteilt (68). Die angegebenen Molekulargewichte ergeben sich aus der Bestimmung der Hydroxylzahl* und stellen Mittelwerte mit erheblichen Schwankungen dar.

Bei den im nächsten Abschnitt beschriebenen kinetischen Untersuchungen der Veresterung von PEG mit Aminosäurederivaten hat sich gezeigt, daß bei quantitativer Veresterung erhebliche Abweichungen von der theoretischen und experimentell ermittelten Kapazität (bis zu 30 %) des PEG auftraten.

---

* Die Hydroxylzahl (OHZ) ist eine handelsübliche Größe zur Charakterisierung der OH-Gruppenkapazität und ist wie folgt definiert: OHZ = mg KOH/g Substanz (s. dazu Gleichung 2 auf Seite 12).

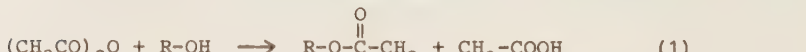
Die bisher übliche Angabe des Veresterungsgrades in Bezug auf das mittlere Molekulargewicht ohne vorherige Ermittlung der Hydroxylzahl scheint deshalb wenig sinnvoll und führt zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die exakte Kenntnis der Hydroxylzahl ist neben der Bedeutung, die sie für die LPM (Kapazität, Veresterungsgrad, kinetische Untersuchungen) besitzt, vor allem Voraussetzung für die Darstellung von Blockcopolymeren, bei denen PEG-Blöcke mit äquimolaren Mengen von substituierten Diisocyanaten zu hochpolymeren Verbindungen umgesetzt werden (66):



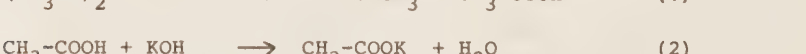
X = Halogen, OH, NH_2

Polymere dieses Typs wurden verschiedentlich zur Synthese eingesetzt und stellen vielfach verwendbare funktionalisierte Träger mit guten Löslichkeitseigenschaften dar (66, 78-80). Die Molekulargewichte liegen bei optimalen Reaktionsbedingungen über 10^5.

Die bisher angewandten Methoden zur Hydroxylzahlbestimmung in Polymeren sind mit erheblichen Fehlerquellen und Unsicherheiten behaftet (81-83). Die am häufigsten durchgeführte Acylierungsmethode (82) unterliegt der Gefahr eines nicht quantitativen Umsatzes in Schritt (1) sowie der Verfälschung des Titrationswertes (2) durch Hydrolyse von Acetanhydrid bei Anwesenheit von Wasserspuren. Die relativ aufwendige Methode besitzt deshalb eine große Fehlerbreite und erfordert große Polymerproben.



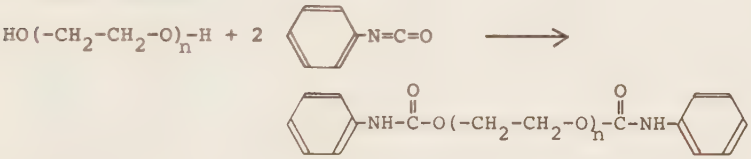
(1)



(2)

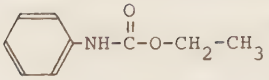
3.1.2. Spektroskopische Ermittlung der Hydroxylzahl

Die hier entwickelte spektroskopische Methode zur Hydroxylzahlbestimmung umgeht diese Fehlerquellen: PEG wird dabei mit überschüssigem Phenylisocyanat unter Zugabe eines Katalysators umgesetzt; das gebildete Urethan wird durch Kristallisation isoliert und die Hydroxylzahl spektroskopisch durch Messung der Phenyl-Absorptionsbande bei λ= 235.5 nm bestimmt.

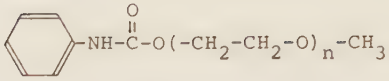


Kinetische Untersuchungen haben ergeben, daß die Reaktion von Phenylisocyanat mit PEG innerhalb kürzester Zeit quantitativ verläuft (84, 85). Der Reaktionsverlauf ist wegen der allgemeinen Bedeutung dieser Reaktion für die Synthese von Polyurethanen genau untersucht worden: Geringe Abweichungen vom linearen Verlauf der Reaktion basieren auf einer Beschleunigung in der Endphase der Reaktion infolge eines katalytischen Effektes der gebildeten Urethangruppierung. Anhand der vorliegenden Befunde kann ein quantitativer Ablauf der Reaktion selbst bei minimalen Überschüssen einer Komponente als gesichert angesehen werden. Die eigenen Untersuchungen stützen diesen Befund. Da die quantitative Abtrennung des überschüssigen Isocyanats wegen der hohen Kristallisationstendenz von PEG unproblematisch ist, wird eine hohe Reproduzierbarkeit der Methode erreicht.

Es galt zu prüfen, ob und in welchem Umfang die PEG-Kette einen elektronischen Effekt auf die Phenylgruppe und damit auf den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{235.5}$ ausübt. Zur Klärung dieser Frage wurden folgende Modellverbindungen synthetisiert:



(1)



(2) n = 1,2

Verbindung (1) und (2) mit n = 1 werden kristallin erhalten, Verbindung (2) mit n = 2 fällt als Öl an. Im interessierenden UV-Bereich besitzen alle drei Verbindungen identische Absorptionsbanden (Abb. 4); innerhalb der Messgenauigkeit von ± 2% ergeben sich für die Absorption bei 235,5 nm gleiche Extinktionskoeffizienten, sodaß ein induktiver Effekt der Oxygruppen ausgeschlossen werden kann. Auch die Zugabe von PEG zu (1) bzw. (2) hat keinen Einfluß auf den Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{235,5}$. Für die Ermittlung der Hydroxylzahl wird deshalb bei allen Bestimmungen der molare dekadische Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{235,5} = 17'500$ verwendet.

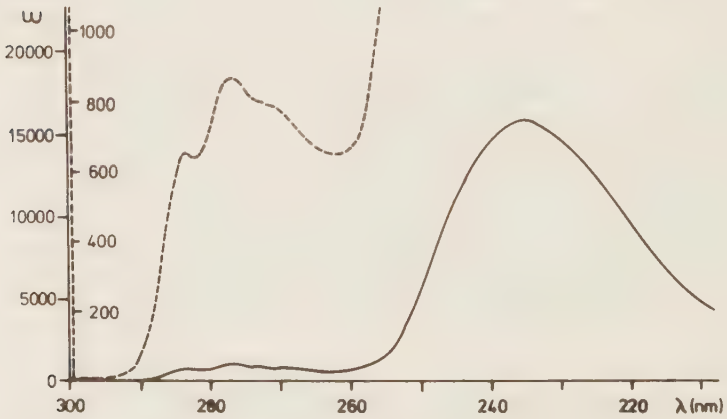


Abb. 4: UV-Spektrum der Urethane (1) bzw. (2) für n = 1,2

3.1.3. Beispiele

a) Zunächst wurden die Hydroxylzahlen von verschiedenen PEG-Typen bestimmt. Dabei ergaben sich Abweichungen vom Typen-Molekulargewicht (z.B. 10000) bis zu 30 %, die im Falle der untersuchten Charge von PEG 10 000 außerhalb des vom Hersteller angegebenen Bereichs des mittleren Molekulargewichts ($\bar{M}_n$) lag. Die ermittelten mittleren Molekulargewichte lagen bei 2 Proben über dem Typen-Molekulargewicht, sodaß die tatsächliche Kapazität an Hydroxylgruppen geringer war als erwartet.

PEG-Type	angegebene Hydroxyl-zahl	$\bar{M}_n$	exp. Hydroxyl-zahl	$\bar{M}_n$ exp.	Kapazität (mM OH-Gruppen/ g PEG)
20 000	<6.6	ca. 20000	5.7	19'700	0.102
10 000	9.3-13.2	8500-12000	8.5	13'200	0.152
3 000	34 - 42	2700-3300	34.4	3'300	0.613

Die so ermittelten Kapazitäten decken sich gut mit den aus der Veresterung von PEG mit N^{α}-BOC-Glycin erhaltenen Daten. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist bei sorgfältigem Arbeiten sehr hoch; die Standardabweichungen liegen bei ca. 2 %.

b) Eine weitere Anwendung der spektroskopischen Bestimmung der Hydroxylgruppenkapazität besteht in der Ermittlung des Veresterungsgrades nach Fixierung der C-terminalen Aminosäure an PEG, die häufig unvollständig verläuft. Sie kann somit die zeitlich aufwendige Aminosäureanalyse bei diesem Schritt ersetzen. Ebenso kann auf Beladungsverluste während der Peptidsynthese getestet werden. Durch die extrem hohe Reaktionsgeschwindigkeit besteht eine weitere Anwendung darin, die Kinetik einer Veresterungs- bzw. einer

Kupplungsreaktion zu verfolgen: Dabei werden dem Reaktionsgemisch in zeitlich definierten Abständen Proben entnommen und mit Phenylsiocyanat versetzt. Nach Entfernung überschüssiger Reagenzien wird durch die Extinktionsmessung bei λ = 235,5 nm die Kinetik der Reaktion verfolgt. Diese Methode hat sich vor allem bei langsam verlaufenden Veresterungsreaktionen bewährt.

c) Die Methode eignet sich allgemein zur Bestimmung von Hydroxylzahlen von Polymeren. Die Abtrennung der überschüssigen Komponenten kann dabei durch Gelchromatographie erfolgen, wie im experimentellen Teil am Beispiel von PEG, Mol.Gew. 10 000, beschrieben wird.

3.2. Veresterungsversuche an PEG

Ein zentrales Problem der LPM besteht in der Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit PEG . Wegen der ohnehin geringen Kapazität des PEG ist es wichtig, hohe Veresterungsgrade zu erzielen. Es wurde gefunden, daß die verschiedenen Aminosäuren je nach sterischer Hinderung durch ihre Seitenkette zu sehr unterschiedlichen Veresterungsgraden führen. In allen Fällen werden bisher sehr lange Reaktionszeiten (bis zu 7 Tagen) gewählt, wobei zusätzlich oft relativ drastische Bedingungen wie hohe Überschüsse und Temperaturerhöhung angewendet werden. Bei Veresterungsversuchen hat sich nun herausgestellt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit sterisch ungehinderter Aminosäuren wie z.B. N^{α}-BOC-Glycin wesentlich höher liegt als bisher angenommen wurde: Selbst unter schonenden Bedingungen (Raumtemperatur, 4-facher Überschuß an aktivierter Aminosäure) war die Veresterung nach 45 Min. mit PEG vom Typ 10 000 quantitativ verlaufen (Abb. 5). Aus der Aminosäureanalyse ergab sich eine Beladung von 75 % $\pm$ 2 %, d.h. 0.75 mM Aminosäure pro 5 g PEG 10 000. Alle Versuche, diese Beladung zu erhöhen (siehe Tabelle 18, S.151), nämlich

- Verlängerung der Reaktionszeit (bis 72 h)
- Erhöhung der Temperatur auf 40-45°C
- Erhöhung der Überschüsse an aktiviertem BOC-Gly (bis 8-fach)
- Variation des Lösungsmittels, der Kupplungsmethode (symmetrisches Anhydrid durch Phosgen) und des Katalysators (Triäthylamin)

waren erfolglos.

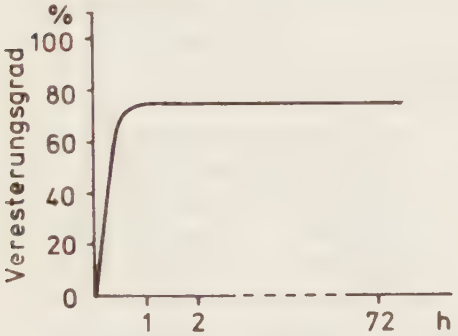


Abb. 5: Verlauf der Veresterung von PEG 10000 mit BOC-Gly

Diese Beobachtungen führten zur Ausarbeitung einer unabhängigen Bestimmungsmethode der Hydroxylgruppenkapazität, wie sie in Kapitel II.3.1. beschrieben ist. Es ergab sich, daß das mittlere Molekular-Gewicht des verwendeten PEG bei 13 200 lag, die Hydroxylgruppenkapazität bei 0.76 mM/5 g PEG und somit die Ausbeute der Veresterung 100 % d.Th. entsprach. Als wesentliches Resultat kann festgehalten werden, daß die Veresterungsreaktion von PEG mit BOC-Gly-Anhydrid bei Zusatz von Pyridin als Katalysator in CH_2Cl_2 bei Raumtemperatur innerhalb von 45 Min. quantitativ verläuft. Dagegen läßt sich unter ähnlichen Reaktionsbedingungen mit BOC-Glutamin nur eine Ausbeute von ca. 80 % erzielen. Als Katalysatoren eignen sich Pyridin und Dibutylzinndilaurat, während Triäthylamin bei gleichen Reaktionszeiten zu schlechteren Ausbeuten führt.

3.3. Zwischenfällungen bei der Peptidkupplung

Wie bereits erwähnt, haben kinetische Untersuchungen gezeigt, daß sich PEG-Peptide wie niedermolekulare Peptidester verhalten, sodaß von homogenen Reaktionsbedingungen gesprochen werden kann. Abweichungen von der Homogenität aller funktioneller Gruppen am PEG-Peptid könnten sich in hochkonzentrierten Polymerlösungen ergeben, bei denen die Kettenbeweglichkeit infolge einer netzwerkartigen Struktur stark herabgesetzt ist. Unter diesen Bedingungen durchdringen sich die Polymerknäuel gegenseitig und die Viskosität der Lösung nimmt zu. Aus den Kettendimensionen läßt sich die kritische Konzentration, bei der eine Verhakung der Knäuelmoleküle eintritt, errechnen (37). Unter den üblichen Bedingungen der Kupplungsreaktion liegt eine derartige Netzwerkstruktur vor, während die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen an sog. Partikellösungen (siehe Abb. 11) gewonnen wurden. Es gibt inzwischen qualitative Befunde, die dafür sprechen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in der Endphase der Kupplungsreaktion etwas absinkt, was zu verlängerten Reaktionszeiten führt. Häufig wurde gefunden, daß erst eine "Nachkupplung" zu quantitativem Reaktionsverlauf führt. Der Schluß liegt deshalb nahe, daß dieser Tatbestand auf gewisse Inhomogenitäten der konzentrierten Reaktionslösung zurückzuführen ist. Auf der Basis dieser Erfahrungen wird deshalb die Kupplungsreaktion wie folgt modifiziert:

i) Die Peptidkupplung wird in hochkonzentrierter Lösung mit 2- bis 3-fachem Überschuß an aktiver Komponente durchgeführt um eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit zu gewährleisten.

ii) Nach 30 bis 60 Minuten wird eine Zwischenfällung durchgeführt, bei der dem Reaktionsgemisch soviel Äther zugetropft wird, bis das PEG-Peptid auskristallisiert.

iii) Der zugegebene Äther wird sofort abgezogen und die Kupplung ohne weitere Zugabe von aktiver Komponente fortgesetzt.

Je nach Peptidkupplung erfolgt die Zwischenfällung nach wenigen Minuten oder mehreren Stunden; unter Umständen wird die Zwischenfällung wiederholt.

In allen bisher beobachteten Fällen konnte auf diese Weise eine Nachkupplung umgangen werden. Die Erklärung ergibt sich aus der Tatsache, daß PEG-Peptide beim Ausfällen kristallin anfallen (7_2-Helix), somit einem drastischen Konformationsübergang (Knäuel ⟶ Helix) unterliegen und beim Wiederauflösen eine neue Zufallskonformation einnehmen (Abb. 6).

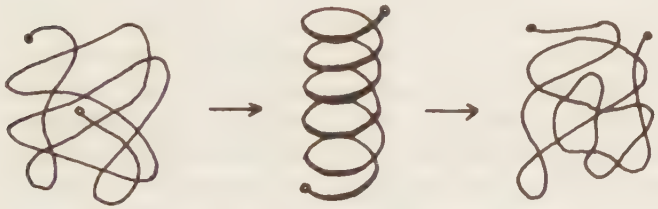


Abb. 6: Konformationsübergang eines PEG-Peptids beim Fällen und Wiederauflösen.

Durch Aggregation von Peptidketten (z.B. bei der Ausbildung von ß-Strukturen) entstandene Inhomogenitäten der Reaktionsorte, die nicht vom Polymer herrühren müssen, werden auf diese Weise aufgehoben: Die schichtartige Anordnung der PEG-Ketten im Kristall erzwingt auch einen Wechsel der lokalen Umgebung der Peptidkette, der sich möglicherweise auf die Reaktivität auswirken kann. Diese Hypothese wird von Beobachtungen von Morawetz et al. an löslichen polyfunktionellen Trägern unterstützt (53, 86).

Die Tatsache, daß im System der Liquid-Phase-Methode keine unzugänglichen Reaktionsorte entstehen - wie dies bei

heterogenen und polyfunktionellen Trägern beobachtet wird - ist von elementarer Bedeutung für diese Synthesestrategie.

3.4. Kristallisation von PEG-Peptiden

Die Möglichkeit, PEG-Peptide kristallin zu fällen, hat das Syntheseverfahren stark vereinfacht (17). Auf diese Weise entfällt der früher zur Entfernung überschüssiger Komponenten durchgeführte Ultrafiltrationsschritt, der nicht unproblematisch und vor allem zeitaufwendig ist (16).

Das PEG-Peptid kann durch Ausfällung mit Äther oder durch Umkristallisation aus Äthanol isoliert werden. Das zweite Verfahren ist vor allem bei schwerlöslichen Aminosäurederivaten vorzuziehen. Während beide Methoden für die Anwendung im Labor unproblematisch sind, besitzen sie hinsichtlich einer industriellen Anwendung des Syntheseverfahrens gravierende Nachteile (Explosionsgefahr, Kosten). Bei der Synthese der hydrophoben Oligomere (siehe unten) wurde deshalb erstmals versucht, Äthanol durch das wesentlich billigere Methanol zu ersetzen. Aus dem Löslichkeitsverhalten von PEG in Methanol war zu schließen, daß dies grundsätzlich möglich sein sollte: während PEG in Äthanol bei ca. 33°C in Lösung geht (Abb. 7), findet dieser - bei Polymeren häufig beobachtete - große Sprung im Löslichkeitsverhalten durch geringe Temperaturerhöhung in Methanol bei ca. 8°C statt.

Umgekehrt kristallisiert PEG bei Unterschreitung dieser kritischen Temperatur nahezu quantitativ aus. Selbst aus hochverdünnten Lösungen ($\sim 0.1\%$) läßt sich PEG vom Mol.-Gewicht ≥ 4000 vollständig auskristallisieren. PEG-Peptide zeigen ähnliches Verhalten, allerdings fallen die Kristallite wesentlich kleiner an, sodaß die Filtrierbarkeit in manchen Fällen erschwert ist; die Isolierung des PEG-Peptids kann hier durch Zentrifugation problemlos durchgeführt werden.

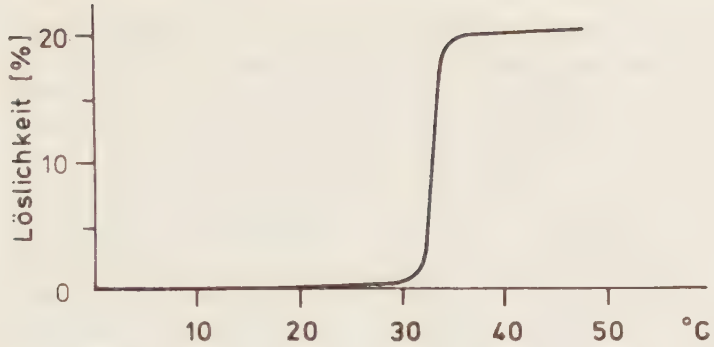


Abb. 7: Löslichkeit von PEG in Äthanol

Wegen der guten Löslichkeit der Aminosäurederivate in Methanol genügte in allen bisherigen Anwendungen dieser Kristallisationsmethode einmaliges Umkristallisieren. Dazu wird das PEG-Peptid aus konzentrierter Lösung mit Äther gefällt, abfiltriert, in Methanol (ca. 5%-ige Lösung) bei ca. 30° C aufgenommen und über Nacht bei 0° - 4°C auskristallisiert. Soll die Ätherfällung ganz umgangen werden, wird die Reaktionslösung nach beendeter Kupplungsreaktion eingedampft. Die Umkristallisation aus Methanol hat sich gerade bei den schwerlöslichen, hydrophoben Oligopeptidestern gut bewährt (s.u.).

4. Oligopeptide

4.1. Spezielle Aspekte

Oligopeptide eignen sich hervorragend als Modellverbindungen zum Studium von Sekundärstrukturen wie α-Helix, ß-Struktur oder "Bend"-Konformationen in Polypeptiden und Proteinen (4, 5). Systematische Untersuchungen an verschiedenen Homooligopeptiden - insbesondere an Oligo-L-Glutaminsäure-γ-Benzylester und Oligo-L-Lysin - haben wesentlichen Aufschluß

gebracht über Endgruppeneffekte, Lösungsmitteleinfluß und die Rolle der kurz- und weitreichenden Wechselwirkungen auf die Konformation (87-89). Außerdem liefert die Konformationsanalyse dieser Oligomere wesentliche Information über das spektroskopische Verhalten geordneter Strukturen.

Von besonderem Interesse sind Homooligomere, die eine starke Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen besitzen und somit eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung geordneter Strukturen in Proteinen spielen. Dazu zählen vor allem die apolaren Aminosäuren, die infolge van der Waal'scher und hydrophober Wechselwirkungen oft in ß-artigen Strukturen vorliegen. Die hydrophoben Seitenketten, verbunden mit der Tendenz zur Aggregation verleihen diesen Peptiden hinsichtlich der Synthese äußerst ungünstige Löslichkeitseigenschaften. Systematische Konformationsuntersuchungen dieser Oligomere scheiterten deshalb in der Vergangenheit vielfach an unüberwindlichen synthetischen Schwierigkeiten. Zur Umgehung des Löslichkeitsproblems wurde versucht, solubilisierende Schutzgruppen an beide Kettenenden der Oligomere zu fixieren. Vor allem sollte erreicht werden, daß das Peptid auf diese Weise in Helix fördernden Lösungsmitteln, die bei Konformationsuntersuchungen Verwendung finden, genügend solubilisiert wird. Gratzer und Doty (90) führten Untersuchungen an einem Poly-L-Alanin-Block durch, der von zwei Poly-D,L-Glutaminsäure-Blöcken flankiert war (1):

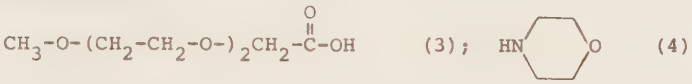
$$(D,L\text{-}Glu)_m - (L\text{-}Ala)_n - (D,L\text{-}Glu)_m \qquad (1)$$

Ingwall und Scheraga (91) verwendeten ebenfalls ein Blockcopolymer auf der Basis von D,L-Lysin (2):

$$(D,L\text{-}Lys)_m - (L\text{-}Ala)_{10} - (D,L\text{-}Lys)_m \qquad (2)$$

Wegen der Gefahr eines Einflusses der polymeren, peptidartigen Flankengruppen, die auch hinsichtlich der spektroskopischen Untersuchungen ungünstig waren, versuchten

Goodman et al. die Polypeptidblöcke durch niedermolekulare, nicht peptidartige solubilisierende Schutzgruppen zu ersetzen (92, 93). Dazu wurden folgende Gruppen verwendet:



(3); (4)

Diese Schutzgruppen wurden nachträglich am C- bzw. N-Terminus des Peptids fixiert. Auf diese Weise gelang es $(Ala)_n$ bis zu n = 9 zu solubilisieren und spektroskopisch durch Messung des Zirkulardichroismus (CD) zu untersuchen. Obwohl die solubilisierenden Schutzgruppen (3) und (4) gegenüber (1) und (2) eindeutige Vorteile besitzen, hat diese Methode zur Solubilisierung von schwerlöslichen Peptiden keine weitere Anwendung gefunden. Der Grund liegt zweifellos im enormen präparativen Aufwand: Zunächst bereitet die Synthese der Oligomere ohne solubilisierende Schutzgruppen außergewöhnliche Schwierigkeiten; die nachträgliche Einführung von (3) bzw. (4) in die fast unlöslichen Oligomere verläuft mit äußerst geringen Ausbeuten. Hinzu kommt der Nachteil, daß auf diese Weise nur beidseitig blockierte Oligomere studiert werden können. Dies kann gerade im niedermolekularen Bereich der Oligopeptide von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung einer Sekundärstruktur sein; es gibt Hinweise, daß vor allem das Aminoende einen starken Einfluß auf die Stabilität einer Sekundärstruktur ausübt (93). Deshalb wäre es wünschenswert, Peptide mit und ohne Aminoschutzgruppen untersuchen zu können. Diese Möglichkeit ergibt sich bei Peptiden, die nach der LPM synthetisiert werden. Diese können vor und nach der Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe ohne weitere Vorbehandlung direkt einer CD-Messung zugeführt werden (siehe Kap. III).

In dieser Arbeit werden erstmals systematische Konformationsuntersuchungen an PEG-gebundenen Oligopeptiden durchgeführt. Neben den im Zusammenhang mit der Konformation dieser Oligopeptide interessierenden Aspekten (Kap. III) galt es, erste präparative Erfahrungen bei der Synthese hydrophober PEG-gebundener Peptide zu sammeln. Insbesondere ging es um die Klärung der Frage, wie sich das physikalisch-chemische Verhalten der PEG-Peptide mit wachsender Kettenlänge verändert und welche Modifizierungen sich daraus für den Synthesezyklus ergeben. Zunächst wird die Synthese des Oligoalanins bis zur Stufe des Dekapeptids beschrieben; bisher war es nicht gelungen, dieses Oligomer ohne N-terminale Schutzgruppe zu synthetisieren. Die präparativ äußerst schwierig zugänglichen und von der Konformation her sehr interessanten Oligomere des L-Valins und L-Isoleucins werden in Kap. II.4.3. bzw. 4.4. behandelt.

4.2. Oligo-L-Alanin (94)

a) Syntheseplan

Als C-terminale Schutzgruppe wurde PEG, Mol.-Gew. 6 000 gewählt. Da die Veresterung des PEG mit BOC-Alanin in guten Ausbeuten verläuft, wurde auf eine Ankergruppe verzichtet. Die Synthese wurde mit einer Beladung von 80% d.Th. begonnen. Die nachträgliche Bestimmung der Hydroxylgruppenkapazität des PEG ergab, daß die Veresterung quantitativ verlaufen war (Mol.-Gewicht nach Hydroxylgruppenbestimmung = 7500). Die Kupplung erfolgte zunächst mit 3-fachem Überschuß an BOC-Alanin-Anhydrid, das nach der DCC-Methode separat dargestellt wurde (95). Die Umsatzkontrolle erfolgte durch quantitative Ninhydrinreaktion (96). Die überschüssigen Komponenten wurden bei quantitativem Umsatz nach der Kristallisationsmethode durch Zugabe von Diäthyläther zur Kupplungslösung entfernt. Die Abspaltung der N-terminalen BOC-Schutzgruppe erfolgte durch Behandeln mit Trifluoressigsäure/Methylenchlorid (1:1).

b) Syntheseverlauf

In den Stufen 1-7 war die Kupplungsreaktion nach ca. 60 Min. zu über 99% verlaufen. Ab Stufe 8 wurde über Nacht gekuppelt. Die Viskosität des PEG-Peptids in CH_2Cl_2 nahm mit wachsender Kettenlänge kontinuierlich zu. Aus diesem Grund wurden ab Synthesestufe 5 steigende Mengen N,N-Dimethylformamid (DMF) und Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Kupplungslösung zugesetzt. Ab Stufe 8 wurde in einer Mischung von DMF und DMSO gekuppelt, da die Löslichkeit in CH_2Cl_2 nicht mehr ausreichte um eine homogene, rührbare Lösung zu erhalten. Bei der Fällung des PEG-Peptids mit Äther wurde ab Stufe 5 zunächst eine hochviskose, amorphe Masse erhalten, die schwer rührbar war. Die Kristallisation des PEG setzte ein, nachdem das gefällte Produkt in Eis längere Zeit (ca. 2 h) gerührt wurde. Anschließend konnte das PEG-Peptid wie üblich abfiltriert werden. Die Beladung des PEG mit $(L\text{-Ala})_{10}$ betrug 70% (bezogen auf Mol.-Gew. = 6000); der Verlust betrug somit ca. 10%. Zur Charakterisierung des Endprodukts wurde eine Probe hydrolysiert und dünnschichtchromatographisch untersucht. Die durch die Schwerlöslichkeit des Peptids limitierten analytischen Testmöglichkeiten ergaben, daß das Produkt einheitlich war. Nach Ankupplung eines Glycinrestes an $(L\text{-Ala})_{10}$-PEG, Hydrolyse und Aminosäureanalyse war das Verhältnis von Gly zu Ala 1:9.5, was die hohe Reinheit des Peptids bestätigte. Die beim CD gemessenen Elliptizitäten (siehe III.3.1.) entsprechen in den vergleichbaren Stufen denen niedermolekularer Peptidester (93, 97). Der Test auf Racemisierung durch Gaschromatographie (98) ergab, daß während der Synthese keine Racemisierung stattgefunden hatte*.

---

* Herrn G. Nicholson danke ich für die Durchführung der Racemisierungstests.

4.3. Oligo-L-Valin

a) Allgemeine Aspekte

Wegen des hydrophoben Charakters dieses Oligomers wurde PEG, Mol.-Gew. 20 000 als C-terminale Schutzgruppe gewählt. Zunächst wurde PEG mit BOC-Glycin (BOC-Gly) quantitativ verestert. Die Einführung einer Ankergruppe (Glycin) zwischen Oligomer und PEG hat folgende Vorteile:

- Die Veresterung mit BOC-Gly verläuft quantitativ, sodaß die volle Kapazität des PEG ausgenutzt wird und keine funktionellen Gruppen am Polymer zurückbleiben, die im weiteren Syntheseverlauf durch nachträgliche Veresterung zur Bildung von Fehlpeptiden führen können.
- Die Produktcharakterisierung bei der Synthese von Homooligomeren durch Aminosäureanalyse wird erheblich erleichtert: der Glycinrest dient als innerer Standard und ist Bezugspunkt für das Verhältnis der gekuppelten Aminosäurereste.
- Aus den bisherigen Konformationsuntersuchungen kann geschlossen werden, daß der Glycinrest keinen Einfluß auf die Konformation bzw. die Elliptizitätswerte des zu untersuchenden Oligomers hat. Somit ist ein direkter Vergleich zwischen PEG-Glycin-gebundenen Oligomeren und Oligomeren mit niedermolekularen säureamidartigen C-terminalen Schutzgruppen (87) - z.B. der häufig verwendeten Gruppierung $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}NHCH_2CH_3$ - möglich.

Die Einführung eines Glycin-Zwischenankers kann deshalb allgemein bei Homooligomersynthesen nach der LPM empfohlen werden.

b) Syntheseverlauf

Wie im Falle der Oligo-Alanin-Synthese nahm die Viskosität mit wachsender Kettenlänge stark zu. Besonders drastisch war

der Viskositätsanstieg zwischen den Stufen 4 - 6. Auffallend waren die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften von N-BOC-geschütztem und N-ungeschütztem PEG-Peptid: Während die Oligomere mit freier Aminogruppe in allen Stufen (1-8) in Mischungen aus CH_2Cl_2/DMF verhältnismäßig niedrig viskose, gut rührbare Lösungen ergaben, trat nach Zugabe der aktiven Komponente nach wenigen Sekunden eine starke Viskositätserhöhung ein, wobei eine geleeartige, nicht rührbare Masse erhalten wurde, die erst bei Verdünnung mit DMF allmählich in eine niedrig viskose Lösung überging. Vermutlich handelt es sich hierbei um einen Konformationswechsel (Knäuelstruktur → ß-strukturartige Aggregatbildung der Peptidketten). Die unterschiedliche Polarität der Endgruppen erscheint für eine derartige Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Makromoleküls nicht ausreichend zu sein. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Synthese sequentieller Peptide gemacht (74, 94).

Der stufenweise Aufbau wurde bis zur Stufe des Oktapeptids geführt. $(L\text{-Val})_8$-Gly-PEG war noch löslich in DMF und TFA/CH_2Cl_2 (2:1), sodaß eine Fortsetzung der Synthese möglich ist. Da in diesem Falle niedermolekular solubilisierte Oligomere nur bis zu dieser Stufe vorliegen und die geplanten Konformationsuntersuchungen nur im Bereich von n = 5-8 von Interesse sind, wurde eine Zwischenfällung des PEG-Peptids (siehe Kap. II.3.3.) vorgenommen. Die Kupplungsreaktionen wurden über Nacht durchgeführt, wobei der Fluramtest (96, 99) in allen Stufen quantitative Reaktion anzeigte. In einzelnen Synthesestufen wurden die überschüssigen Reagenzien durch Umkristallisation des PEG-Peptids aus MeOH entfernt. In allen Fällen reichte einmaliges Umkristallisieren, wobei die Verluste an Polymerpeptid unter 5 % lagen. Das Oktapeptid war nach den Kriterien Aminosäureanalyse und Dünnschichtchromatographie einheitlich.

4.4. Oligo-L-Isoleucin

Oligo-[L-Ile] bildet infolge starker hydrophober Wechselwirkungen der Seitenketten die stabilsten intermolekularen Strukturen (ß-Struktur) aus und neigt auch schon bei kurzen Kettenlängen zu Aggregation in fast allen Lösungsmitteln (100, 101). Es war deshalb zu erwarten, daß die Synthese des Oktapeptids zu großen Löslichkeitsproblemen führt. Um möglichst starke Solubilisierung durch die C-terminale Schutzgruppe zu erreichen, wurde deshalb PEG, Mol.-Gew. 20000 mit Glycin als Zwischenanker (s.o.) benutzt. Überraschenderweise wurde bereits eine 10%-ige Lösung in CH_2Cl_2 während der Kupplungsreaktion zum Tripeptid BOC(L-Ile)$_3$-Gly-PEG hochviskos. Nach Abspaltung der BOC-Gruppe wurde wie bei der Oligo-Val-Synthese eine starke Zunahme der Löslichkeit bzw. Abnahme der Viskosität registriert, ein Verhalten, das sich hier in jeder Stufe drastisch bemerkbar machte: Das Geschützte Pentapeptid war in reinem DMF (10%-ige Lösung) noch löslich, während ab dieser Stufe in einer Mischung aus DMF/DMSO (1:1) gearbeitet werden mußte. Meist hatte die vorübergehende starke Verdünnung der geleeartigen Masse mit CH_2Cl_2 einen positiven Effekt auf die Geschwindigkeit des Lösungsvorgangs der ungeschützten Oligomerstufen. Alle Kupplungsreaktionen wurden wegen der infolge sterischer Hinderung stark herabgesetzten Reaktionsgeschwindigkeit über Nacht durchgeführt, wobei mindestens einmal in jeder Stufe eine Zwischenfällung vorgenommen wurde.

Das N-geschützte PEG-gebundene Oktapeptid löst sich noch in Mischungen von DMF, CH_2Cl_2 und DMSO und ist gut löslich in TFA/CH_2Cl_2. In dem zur CD-Messung verwendeten Lösungsmittel Trifluoräthanol (TFE) ist das Oktapeptid mäßig löslich (bis zu 1% w/v); der Lösungsvorgang dauert mehrere Stunden. Die Kristallisation des PEG-Peptids erfolgte in den höheren Stufen aus verdünnten Lösungen (ca. 1-5% in DMF/DMSO) durch Zugabe von Äther. Nach Rühren im Eisbad werden gut filtrierbare, teilkristalline Produkte erhalten. Alle Kupplungs-

schritte wurden mit dem Fluramtest auf quantitative Reaktion geprüft. Es wurde vor allem nachgewiesen, daß 1% unumgesetzte Aminogruppen noch erkennbar sind. Die Abspaltung der BOC-Gruppe erfolgte erst, wenn mindestens 99% Umsatz erreicht war. Dies war nach über 14-stündiger Kupplungsreaktion mit 4-fachem Überschuß an symmetrischem Anhydrid in allen Stufen erreicht. Die Homogenität des Endprodukts wurde durch Aminosäureanalyse bestätigt. Ein weiterer, stufenweiser Aufbau erscheint bei diesem Peptid wenig sinnvoll. Wegen der geringen Löslichkeit der PEG-Peptide muß in relativ verdünnten Lösungen gearbeitet werden, sodaß die Kupplungszeiten unverhältnismäßig lang werden und die Gefahr nicht quantitativ verlaufender Reaktionen zunimmt. Bei diesem extrem hydrophoben Oligopeptid scheint somit bei ca. 8 - 10 Aminosäureresten die Grenze der stufenweise Synthese an PEG erreicht zu sein.

4.5. Diskussion

Es hat sich gezeigt, daß durch spezifische Modifizierungen des Synthesezyklus auch schwerlösliche, hydrophobe Peptide nach der LPM herstellbar sind. Gerade hier bewährt sich die Verwendung einer polymeren, löslichen Schutzgruppe: Einerseits können schwerlösliche Peptidfragmente noch solubilisiert werden, andererseits bietet der effektive stufenweise Aufbau die Möglichkeit, die extrem schwierigen - z.T. unmöglichen - Kristallisationsschritte des klassischen Verfahrens zu umgehen. Folgende Änderungen gegenüber dem standardisierten Aufbauverfahren nach der LPM haben sich bewährt:

- die Verwendung eines Glycinrestes als Ankergruppe
- die Zwischenfällung während der Kupplungsreaktion
- das Arbeiten in hochkonzentrierten, viskosen Lösungen
- die Entfernung der überschüssigen Komponenten durch Umkristallisieren aus Methanol
- die Ausfällung des PEG-Peptids aus verdünnten Lösungen polarer Lösungsmittel (DMF) mit Äther unter langsamer Kristallisation des PEG-Peptids.

Eine Grenze des stufenweisen Aufbaus nach der LPM wird durch die Schwerlöslichkeit des PEG-Peptids erreicht, die sich nachteilig auf die Kupplungsreaktion auswirkt: Infolge der hohen Verdünnung scheint die Grundforderung der stufenweisen Synthese, der quantitative Umsatz in jeder Stufe, nicht mehr gewährleistet zu sein. Die Schwerlöslichkeit hydrophober Peptidsequenzen beruht vor allem auf intermolekularer Aggregation von Peptidketten. Dies führt wegen des bifunktionellen Charakters von PEG zur Ausbildung von Netzwerkstrukturen, die zu den beobachteten gelartigen, hochviskosen Mischungen führen. Möglicherweise führt die Verwendung von monofunktionellem PEG zu einer entscheidenden Verbesserung der Löslichkeits- bzw. Viskositätseigenschaften von PEG-Peptiden, da solche Netzwerkstrukturen nicht ausgebildet werden können. Während die solubilisierende Wirkung des PEG bei diesen Oligopeptiden auf der Stufe der Dekapeptide eine gewisse Grenze erreicht hat, bleibt sein Einfluß auf die physikalische Natur der festen Polymerpeptide überraschenderweise weitgehend erhalten:
Im Gegensatz zu den niedermolekularen Oligopeptiden fallen die entsprechenden PEG-gebundenen Peptide in Form eines körnigen, gut filtrierbaren Pulvers an. Röntgenographische Untersuchungen haben gezeigt, daß der Kristallisationsgrad von PEG durch Fixierung von Deka-Alanin an beide Kettenenden nur geringfügig abnimmt (Abb. 8). Die weitgehende Erhaltung des Kristallisationsgrades läßt sich dadurch erklären, daß PEG als gefaltete Kette in Schichten vorliegt, wobei nach einem Zweiphasenmodell (37) sich kristalline PEG-Bereiche und amorphe Peptidbereiche abwechseln (73) (siehe dazu Kap. III.3.1.3.). Die Tatsache, daß die physikalischen Eigenschaften von PEG-Peptiden auch bei extrem hydrophoben Peptidsequenzen weitgehend vom PEG bestimmt werden, deutet darauf hin, daß im allgemeinen wesentlich längere Peptide nach diesem Verfahren synthetisiert werden können. Allerdings müssen die jeweils opti-

malen Synthesebedingungen wie beim Beispiel der Oligomersynthesen von Fall zu Fall sorgfältig ermittelt werden.

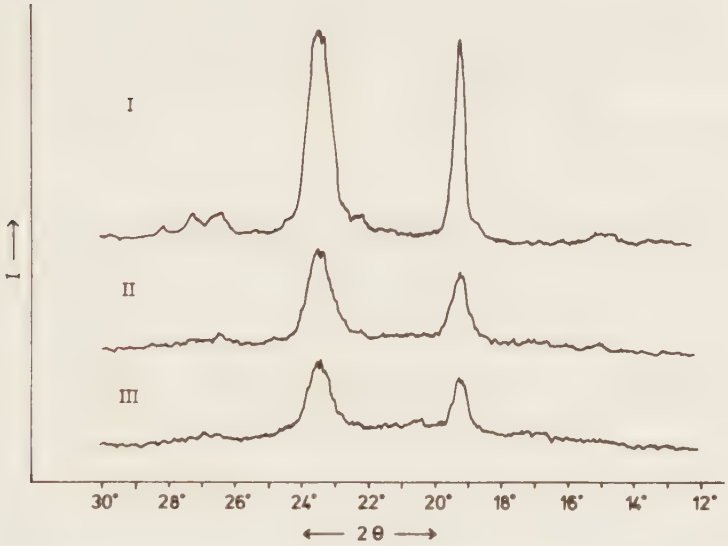


Abb. 8: Röntgenographisches Phasendiagramm von PEG (I), $(Ala)_4$-PEG (II) und $(Ala)_{10}$-PEG (III), Mol.-Gew. 6000

Eine allgemeingültige Festlegung der Synthesebedingungen, wie dies bei der Festkörpermethode praktiziert wird, ist nach den hier gemachten Erfahrungen unmöglich.

5. ACTH-Sequenzen

5.1. Allgemeines

Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) wird in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und kontrolliert als glandotropes Hormon Bildung und Ausschüttung der Neben-

nierenrindenhormone. Hochaktives ACTH wurde zunächst von White (102) und Bell (103) aus Schweinehypophysen und schließlich von Li et al. (104) aus Schafhypophysen isoliert: Die Gewinnung von menschlichem Corticotropin gelang Lee et al. (105) im Jahre 1959. Die Sequenzaufklärung verschiedener Corticotropine ergab, daß die artspezifischen Unterschiede in dem Sequenzteilstück 25 - 33 lokalisiert sind:

ACTH-Sequenzen

Rind:

Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Val	Pro	Gly
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asp	Gly	Glu	Ala
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28

Glu	Asp	Ser	Ala	Gln	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39

Schwein:

Asp	Gly	Ala	Glu	Asp	Gln	Leu	Ala	Glu
25	26	27	28	29	30	31	32	33

Schaf:

Ala	Gly	Glu	Asp	Asp	Glu	Ala	Ser	Gln
25	26	27	28	29	30	31	32	33

Mensch:

Asp	Ala	Gly	Glu	Asp	Gln	Ser	Ala	Glu
25	26	27	28	29	30	31	32	33

Aus diesem Befund kann abgeleitet werden, daß die Sequenz 25 - 33 nicht direkt am Wirkungsmechanismus beteiligt ist und so keinen Einfluß auf die biologische Aktivität ausübt. Durch enzymatische Hydrolyse von Schaf- und Schweinehormon

mit Pepsin wurde gefunden, daß nach Abspaltung des C-terminalen Undekapeptids kein Verlust der biologischen Aktivität eintritt (106 - 108).

Kurz nach der Aufklärung der Primärsturktur von ACTH wurde versucht, die ermittelte Struktur durch chemische Synthese zu bestätigen. Dabei konzentrierten sich die Arbeiten auf die Synthese der N-terminalen, biologisch aktiven Sequenz 1-23. Peptidfragmente mit ACTH-Aktivität wurden in kurzer Folge von Boissonnas (109), Hoffmann (110), Li (111, 112), Schwyzer und anderen synthetisiert, bis schließlich 1963 Schwyzer und Sieber die Totalsynthese von Schweine-ACTH (113, 114) gelang. Inzwischen ist eine fast unübersehbare Anzahl von ACTH-Analogen mit biologischer Wirksamkeit hergestellt worden (29). Aus der Fülle der vorliegenden experimentellen Daten konnten wesentliche Einsichten in den Zusammenhang zwischen Struktur und biologischer Aktivität von ACTH gewonnen werden. Auf diese Beziehungen wird im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Konformationsuntersuchungen an ACTH näher eingegangen (Kap. III.3.2.). Neben vielen erfolgreichen Synthesen nach der konventionellen Strategie wurden auch stufenweise Synthesen von ACTH nach dem Festkörperverfahren beschrieben (115). Die Relevanz der dabei als Kriterium für die chemische Reinheit und Einheitlichkeit der Produkte herangezogenen biologischen Aktivität ist inzwischen verschiedentlich in Frage gestellt worden. Systematische Untersuchungen zur Synthese von ACTH-Sequenzen am festen Träger haben zu unterschiedlichen und zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen geführt.

Trotz des engen Zusammenhangs zwischen Konformation, Primärstruktur und biologischer Aktivität ist bisher nur wenig bekannt über die dreidimensionale Struktur von ACTH (29, 116, 117). Die in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen von ACTH-Sequenzen wurden deshalb mit dem Ziel verfolgt, die aus theoretischen Studien (Kap. III.4.) abgeleiteten Vorhersagen über die Konformation experimentell zu überprüfen.

Untersuchungen dieser Art sind der Ausgangspunkt für gezielte Synthesen von Analogen mit veränderter (z.B. vom präparativen Standpunkt aus vereinfachter) Aminosäuresequenzen unter Beibehaltung der biologischen Aktivität. Die synthetisierten Sequenzen umfassen den N-terminalen, für die biologische Aktivität ausschließlich entscheidenden Bereich 1-23 des ACTH.

5.2. Synthesestrategie

Obwohl bei den hier durchgeführten Untersuchungen Fragen nach der Konformation der synthetisierten Teilsequenzen im Vordergrund stehen, ergeben sich einige interessante, präparative Aspekte im Zusammenhang mit dem Liquid-Phase-Verfahren:

1. Eignet sich der stufenweise Aufbau trotz der Anwesenheit von säurelabilen und seitenkettengeschützten Aminosäureresten?
2. Mit welchen Ausbeuten verlaufen die zum Teil sterisch stark gehinderten Peptidkupplungen am löslichen Polymer?
3. Lassen sich auch schwerlösliche Aminosäurederivate durch die sog. Kristallisationsmethode vom Polymerpeptid quantitativ entfernen?
4. Bleiben die Löslichkeitseigenschaften des PEG nach dem Ankuppeln der ACTH-Ketten erhalten?

Die biologisch aktive Teilsequenz ACTH (1-23) wird in die beiden Fragmente (1-10) bzw. (11-23) aufgeteilt. Beide Fragmente werden nach dem Prinzip der LPM am PEG stufenweise aufgebaut. Sequenz 11-23 zeichnet sich durch die Anwesenheit mehrerer basischer Aminosäurereste aus und wird wie folgt geschützt:

BOC-Lys^{11}(ε-Z)-Pro-Val-Gly-Lys^{15}(ε-Z)-Lys(ε-Z)-Arg(H^+)-Arg(H^+)-Pro-Val^{20}-Lys(ε-Z)-Val-Tyr(OBzl)-OPEG I

Auch das N-terminale Dekapeptid besitzt mehrere trifunktionelle Aminosäurereste und wird in vollgeschützter Form dargestellt als:

BOC-Ser^{1}(OBzl)-Tyr(OBzl)-Ser(OBzl)-Val*-Glu^{5}(γ-Bzl)-
His(H^+)-Phe-Arg(H^+)-Trp-Gly-OPEG II

Als solubilisierende C-terminale Schutzgruppe wird bei der Synthese von (I) PEG, Mol.-Gew. 2 x 10^4 verwendet. Die Aminosäuren werden als N-α-BOC-Derivate eingesetzt, Arginin als N-α-BOC-Hydrochlorid; die Schutzgruppen der restlichen trifunktionellen Aminosäuren sind aus (I) ersichtlich. Die Abspaltung der N-BOC-Schutzgruppe erfolgt mit 1.2 N HCl/AcOH.

Bei der Synthese der Sequenz II wird PEG vom Mol.-Gew. 10^4 verwendet. Auch hier werden die Aminosäuren als N-α-BOC-Derivate eingesetzt, mit Ausnahme von Arginin, das als Z-Arg(Z_2) gekuppelt wird; Histidin wird als Di-BOC-His eingesetzt. Die Abspaltung der N-BOC-Schutzgruppe erfolgt wie oben beschrieben mit 1.2 N HCl/AcOH jedoch ab Stufe 2 unter Zusatz eines Antioxidans, um die Zerstörung des Tryptophans zu verhindern. Die Z-Schutzgruppen von Z-Arg(Z_2) werden durch katalytische Hydrogenolyse entfernt. Als Kupplungsmethode wird ausschließlich die Anhydridmethode (95) verwendet.

Zur Entfernung der überschüssigen Komponenten wird neben der üblichen Kristallisationsmethode die Umkristallisation aus Methanol angewendet. Alle Kupplungsreaktionen werden analytisch durch den Fluram- und Ninhydrintest quantitativ verfolgt.

---

* Die natürliche Sequenz enthält statt Valin einen Methioninrest in Position 4. Die Gründe für diese Substitution werden in Kap. III.4.2. diskutiert.

5.3. Syntheseverlauf und Diskussion

5.3.1. α^{11-23} - ACTH

Der Syntheseverlauf der Teilsequenz BOC-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr –PEG ist in Tab. 1 zusammengefaßt.

	Kupplung	Aktiv.	Ü.	Base	R.z. (h)	Abspalt.	U.(%)
1	$Tyr^{23} \leftarrow Val^{22}$	HOBT	4	N-Methyl-morpholin	15	1.2N HCl/AcOH	>98
2	$Val^{22} \leftarrow Lys^{21}$	"	"	"	3	"	>98
3	$Lys^{21} \leftarrow Val^{20}$	"	"	"	20*	"	>98
4	$Val^{20} \leftarrow Pro^{19}$	"	"	"	12.5	"	>95
5	$Pro^{19} \leftarrow Arg^{18}$	"	"	"	18	"	-
6	$Arg^{18} \leftarrow Arg^{17}$	"	"	"	19	"	>98
7	$Arg^{17} \leftarrow Lys^{16}$	"	"	"	5	"	>98
8	$Lys^{16} \leftarrow Lys^{15}$	"	"	"	14	"	>98
9	$Lys^{15} \leftarrow Gly^{14}$	"	"	"	2	"	>98
10	$Gly^{14} \leftarrow Val^{13}$	"	"	"	24	"	>98
11	$Val^{13} \leftarrow Pro^{12}$	"	"	"	5	"	>95
12	$Pro^{12} \leftarrow Lys^{11}$	"	"	"	14	"	-

* Nachkupplung

Abkürzungen: Aktiv. = Aktivierungsmethode
Ü. = Überschuß
R.z. = Reaktionszeit
U. = Umsatz

Tabelle 1: Reaktionsverlauf der Kupplungsschritte bei der Synthese von PEG-gebundenem Corticotropin-(11-23)-tridekapeptid.

Die Verwendung von HOBt-Estern für die Kupplungsreaktion führt in allen Stufen zu Kupplungsausbeuten von über 98 % nach Ninhydrintest in Lösung (96). Die angegebenen Reaktionszeiten sind Maximalwerte; vermutlich liegen die Kupplungszeiten z.T. wesentlich tiefer. Überraschenderweise verlaufen auch die sterisch stark gehinderten Kupplungen $Arg^{17} \rightarrow Arg^{18}$ bzw. $Arg^{18} \rightarrow Pro^{19}$ zu über 98 %. Diese beiden Kupplungen führten zu erheblichen Schwierigkeiten bei entsprechenden Festphasensynthesen (118). Hierbei hat sich gezeigt, daß das erstmlas in der LPM eingesetzte freie Arginin (in protonierter Form) problemlos verwendbar ist. Es werden keinerlei Nebenreaktionen beobachtet und die Entfernung von überschüssigem BOC(H^+)Arg gelingt durch Fällung des PEG-Peptids aus äthanolischer Lösung mit Äther.
Bei Verwendung freien Arginins können die durch die Argininschutzgruppen (z.B. Nitro-, Tos-) verursachten Abspaltungsprobleme umgangen werden.

Das PEG-Peptid ist in allen Stufen gut löslich in CH_2Cl_2 bzw. in Mischungen aus CH_2Cl_2 und DMF, sodaß sämtliche Kupplungsreaktionen in homogener Phase durchgeführt werden können. Der Ninhydrintest in Lösung zur Umsatzkontrolle erweist sich bei dieser Synthese als besonders vorteilhaft, da hierbei keinerlei Störungen durch Restspuren von HOBt, wie dies beim Fluramtest der Fall ist, auftreten. Selbst bei semiquantitativer Ausführung des Tests lassen sich noch 1 % NH_2-Gruppen nachweisen, da das PEG-Peptid in allen Stufen gut wasserlöslich ist. Als Nachteil muß der relativ hohe Substanzbedarf angesehen werden.

Im Verlaufe der Synthese ist eine Abnahme der Beladung festzustellen, die sich nach 10 Stufen auf ca. 24% (durch Aminosäureanalyse bestimmt) beläuft. In allen Stufen werden Proben für die Konformationsuntersuchungen entnommen.

Zur Endproduktcharakterisierung wird von einer Probe des PEG-Peptids durch alkalische Hydrolyse mit 0.5N KOH das

Peptid vom Polymer abgespalten und dünnschichtchromatographisch untersucht. Das Peptid erweist sich nach den Kriterien DC und Aminosäureanalyse als einheitlich.

r_f = 0.64 (Butanol/AcOH/H_2O = 3:1:1)

Aminosäureanalyse:

	Tyr*	Val	Lys	Pro	Arg**	Gly
gef.	0.62	2.92	4.40	2.00	1.66	1.00
ber.	1.00	3.00	4.00	2.00	2.00	1.00

* 30-40% Tyr werden bei der sauren Hydrolyse zerstört
** ca. 15% Arg werden bei der sauren Hydrolyse zerstört

Nach den vorliegenden Befunden scheint eine Fortführung der stufenweisen Synthese durchaus möglich zu sein: sowohl die physikalischen (Kristallisationsverhalten) als auch die chemischen (Löslichkeit) Eigenschaften des polymergebundenen Tridekapeptids werden noch vom polymeren Anteil (PEG) geprägt; außerdem ist die Reinheit des Produkts trotz Verzicht auf Zwischenreinigungen infolge der hohen Kupplungsausbeuten für einen weiteren stufenweisen Aufbau des Peptids ausreichend. Für die geplanten Konformationsstudien erscheint es jedoch vorteilhaft, das N-terminale ACTH-Fragment (1-10) separat zu untersuchen. Aus diesem Grunde wird die stufenweise Synthese hier abgebrochen.

5.3.2. Val^4-α^{1-10}-ACTH, (Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4)-α^{1-10}-ACTH

Der Syntheseverlauf eines Analogen des N-terminalen Dekapeptids von ACTH mit der Primärstruktur BOC-Ser-Tyr-Ser-Val-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-PEG ist in Tabelle 2 dargestellt.

	Kupplung	Aktiv.	Ü.	Base	R.Z.(h)	Abspalt.	U.(%)
1	$Gly^{10} \leftarrow Trp^{9}$	symm.An. (DCC)	3	N-Methyl-morpholin	1.5	1.2N HCl/ AcOH*	>98
2	$Trp^{9} \leftarrow Arg^{8}$	"	"	"	5**	H_2/Pd	>99
3	$Arg^{8} \leftarrow Phe^{7}$	"	"	"	3**	1.2N HCl/ AcOH*	>99
4	$Phe^{7} \leftarrow His^{6}$	"	"	"	18*	"	>99
5	$His^{6} \leftarrow Glu^{5}$	"	"	"	14	"	>99
6	$Glu^{5} \leftarrow Val^{4}$	"	"	"	16	"	>99
7	$Val^{4} \leftarrow Ser^{3}$	"	"	"	16	"	>99
8	$Ser^{3} \leftarrow Tyr^{3}$	"	"	"	16	"	>99
9	$Tyr^{2} \leftarrow Ser^{1}$	"	"	"	16	"	>99
7	$Val^{4} \leftarrow Ala^{3}$	"	"	"	16	"	>99
8	$Ala^{3} \leftarrow Ala^{2}$	"	"	"	16	"	>99
9	$Ala^{2} \leftarrow Pro^{1}$	"	"	"	16	"	>99

* mit Zusatz von Anisol (5%) und Mercaptoäthanol (5%)

** mit Zwischenfällung

Abkürzungen: Aktiv. = Aktivierungsmethode
Ü. = Überschuß
R.z. = Reaktionszeit
U. = Umsatz

Tabelle 2: Reaktionsverlauf der Kupplungschritte bei der Synthese von PEG-gebundenem $\left[Val^{4}\right]$ Corticotropin-(1-10)-dekapeptid und $\left[Pro^{1}, Ala^{2}, Ala^{3}, Val^{4}\right]$ Corticotropin-(1-10)-dekapeptid

Zur Kupplungsreaktion werden die nach der DCC-Methode dargestellten symmetrischen Anhydride der entsprechenden Aminosäurederivate eingesetzt. Wiederum verlaufen alle Kupplungen

nach dem Fluramtest zu über 99%. Obwohl keine kinetischen Untersuchungen durchgeführt worden sind, haben sich Hinweise dafür ergeben, daß die Kupplungszeit durch Zwischenfällung des PEG-Peptids aus konzentrierter Lösung mit Äther erheblich reduziert werden kann.

Eine besondere Schwierigkeit beim stufenweisen Aufbau dieses Fragments ergibt sich aus der Anwesenheit des Trp^9-Restes. Wegen der Säurelabilität des Indolringes müssen ab Synthesestufe 2 besondere Schutzmaßnahmen bei der BOC-Abspaltung ergriffen werden. Es hat sich gezeigt, daß durch Zusatz von Mercaptoäthanol und Anisol zur 1.2N HCl/AcOH-Lösung unter weitgehendem Ausschluß von Sauerstoff bei der BOC-Abspaltung keine signifikante Zerstörung des Indolringes eintritt (227). Dieser Befund ist vor allem hinsichtlich der stufenweisen Synthese des natürlichen ACTH-Fragments, das Met in Position 4 enthält, von Bedeutung, da in diesem Falle die Verwendung von BOC-Derivaten vorteilhaft ist; Arg^8 wird als Tri(Z)-Derivat eingesetzt. Die Entfernung der Z-Schutzgruppen durch katalytische Hydrierung verläuft ohne Schwierigkeiten. Die Anwesenheit der polymeren Schutzgruppe scheint keinerlei Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrogenolyse zu besitzen. In der Stufe 7 wird der Ansatz halbiert. Neben der natürlichen N-terminalen Sequenz wird an einen Teil des Heptapeptids die Sequenz Ala^3-Ala^2-Pro^1-BOC stufenweise angebaut, die eine besonders starke Tendenz zur Ausbildung einer Helixstruktur besitzt. Beide Dekapeptidester sind trotz des hydrophoben Charakters der Seitenkettenschutzgruppen gut löslich in CH_2Cl_2/DMF-Mischungen. Die Kristallisationseigenschaften unterliegen ebenfalls keinen drastischen Veränderungen.

Wie bei der Synthese des ersten Teilfragments ist ein geringer Beladungsverlust feststellbar (10%). Die Tatsache, daß der Verlust vor allem in den ersten Syntheseschritten eintritt, deutet darauf hin, daß sterische Faktoren beim

Wachsen der Peptidkette eine weitere Spaltung des PEG-Peptidesters verhindern. Diese Beobachtung ist auch bei der Hydrolyse der Insulin-A-Kette gemacht worden (119).

Die Aminosäureanalyse zeigt die hohe Reinheit der Peptide an.

	Gly	Trp	Arg	Phe	His	Glu	Val	Ser	Tyr
gef.	1.00	0.92	0.79	0.98	0.92	1.02	0.95	1.65	0.71
ber.	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	1.00

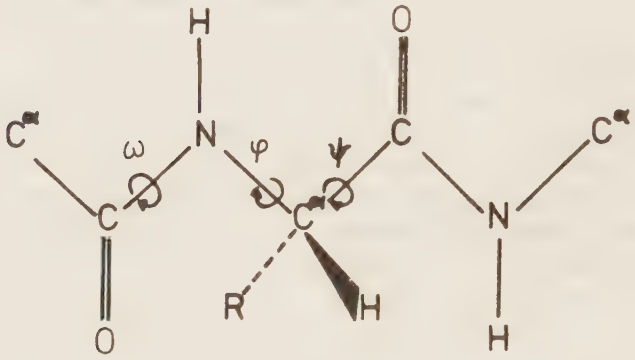
	Gly	Trp	Arg	Phe	His	Glu	Val	Ala	Pro
gef.	1.00	0.94	0.81	1.01	0.90	0.97	0.91	1.92	0.96
ber.	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	1.00

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen einer durch alkalische Hydrolyse abgespaltenen Probe deuten ebenfalls auf ein einheitliches Produkt hin.

III. KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN

1. Allgemeines zur Konformation von Peptiden

Prinzipiell können Peptide bzw. Proteine in einer Vielzahl von Konformationen vorliegen; dies ist eine Folge der Rotationsfreihiet um die C^{α}-C(O)-(Diederwinkelψ) bzw. C^{α}-NH-(φ)-Bindungen entlang dem Peptidgerüst:



Aus röntgenographischen Untersuchungen sind die Werte für die Bindungswinkel und Bindungslängen der Peptideinheit sehr genau bekannt (120, 129) (siehe Tab. 3).

Bindung	Länge (Å)	Winkel	Grad
C^{α}-C	1.53	$C^{\alpha}CO$	120.5
C -N	1.325	$C^{\alpha}CN$	115
N -C^{α}	1.45	CNH	124
N -H	1.00	CNC^{α}	121
C -O	1.23	$NC^{\alpha}C^{\beta}$	110
C^{α}-H^{α}	1.00	$NC^{\alpha}H$	110
C^{α}-C^{β}	1.54	$NC^{\alpha}C^{\beta}$	110

Tabelle 3: Bindungslängen und Bindungswinkel der trans-Peptideinheit [120]

Wegen des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung ist die Rotation um diese Bindung (ω) stark behindert ($v_o \approx$ 10 kcal/Mol), sodaß die Atome einer Peptideinheit (C^{α}-C(O)-N(H)-C^{α}) in einer Ebene liegen. Neuere Röntgenstrukturanalysen an Proteinen haben allerdings ergeben, daß Abweichungen von $\omega = 0°$ (planare Anordnung) bis zu 10° durchaus möglich sind (122). Ebenso häufen sich die Beispiele, in denen die Peptidbindung nicht in der normalerweise gefundenen trans-Konformation, sondern in der energetisch wesentlich ungünstigeren cis-Konformation vorkommen (123): Beispiele hierfür sind zyklische Peptide und Prolin-enthaltende Proteine.

Wegen der thermodynamischen Stabilität definierter dreidimensionaler Strukturen von Proteinen wird die Fülle der sich aus den sterisch erlaubten φ-ψ-Winkelkombinationen entlang der Peptidkette ergebenden möglichen Konformationen stark eingeschränkt. Bei biologisch aktiven Peptiden und Proteinen geht man heute sogar davon aus, daß das jeweilige Makromolekül nur in einer einzigen, der sog. nativen Konformation vorliegt (2). Anfinsen konnte bereits 1961 zeigen, daß die gesamte Information zur Erlangung dieser einzigartigen, dreidimensionalen Struktur (auch Tertiärstruktur genannt) in der Aufeinanderfolge (Sequenz) der Aminosäurebausteine (Primärstruktur) steckt (1): Nach Zerstörung der nativen Konformation (Denaturierung) der Ribonuklease unter vollständigem Verlust der biologischen Aktivität gelang es, die native Konformation - und damit die biologische Aktivität - unter geeigneten Bedingungen wieder zurückzuerhalten (Renaturierung). Als treibende Kraft für die Faltung eines Proteins in die starre, dreidimensionale Struktur werden thermodynamische Größen angesehen (2): Als allgemein akzeptierte Arbeitshypothese zur Berechnung dieser Struktur geht man heute davon aus, daß die native Konformation ein Minimum in der freien Energie des Gesamtsystems (Protein plus Lösungsmittel) besitzt (8, 124-126).

Die dreidimenisonale Anordnung zeichnet sich durch geordnete Struktureinheiten aus, die durch regelmäßige Aufeinanderfolge bestimmter Diederwinkelpaare zustande kommen und durch Wasserstoffbrücken zwischen Carboxylsauerstoffatomen und Amidwasserstoffatomen verschiedener Peptidbindungen stabilisiert werden (Sekundärstruktur).

Bereits 1928 schlugen Meyer und Mark (127) aufgrund von röntgenographischen Untersuchungen eine regelmäßige Faltung von fibrinogenen Proteinen vor. Zu einem Durchbruch auf dem Gebiet der Konformationsanalyse von Proteinen verhalfen schließlich die theoretischen Vorhersagen der drei fundamentalen Strukturprinzipien in Proteinen - α-Helix, ß-Struktur (ß-Faltblattstruktur) und ungeordnete Gerüstkonformation* - durch Pauling et al. (128, 129) im Jahre 1951. Diese Strukturen wurden anschließend zunächst in synthetischen Polypeptiden nachgewiesen und schließlich auch als dominierende Strukturmerkmale in Proteinen gefunden. Als wesentliche zur Stabilität der dreidimensionalen Struktur beitragende Kräfte wurden ermittelt:

- Wasserstoffbrückenbindungen; zuerst von Astbury entdeckt (130) und von Mirsky und Pauling (131) in der Bedeutung für die Sekundärstruktur erkannt,
- hydrophobe Bindungen (Kauzmann (132, 133)),
- Salzbindungen
- van der Waals-Wechselwirkungen
- intramolekulare chemische Bindungen, z.B. S-S-Brücken

---

* Wird auch als Knäuelstruktur ("random coil") bezeichnet. Da es sich hierbei aber um starre, unregelmäßige Anordnungen des Peptidgerüsts und nicht - wie bei synthetischen Polymeren - um ein Gleichgewicht vieler flexibler Knäuelmoleküle handelt, ist der Begriff ungeordnete Struktur vorzuziehen.

Synthetische Polypeptide sind ideale Modellverbindungen für Konformationsuntersuchungen, da sie in einer Vielzahl von Konformationen vorliegen können, die auch in Proteinen gefunden werden (4). Bereits früh wurde erkannt, daß Homooligopeptide im Festzustand in der α-Helix, der ß-Struktur und als ungeordnetes Knäuel vorliegen können (oder als Gemisch dieser Strukturen). Später stellte man fest, daß der Polymerisationsgrad, d.h. die Kettenlänge dieser Oligomere, einen entscheidenden Einfluß auf die Konformation im Festzustand und in Lösung besitzen (4). Ein typischen Beispiel ist Poly(γ-Benzyl)-L-Glu, das Helixstruktur hat, während die niedermolekularen Oligomere in der ß-Struktur vorliegen (134). Blout et al. fanden, daß die Konformation von Homopolypeptiden von der Art der jeweiligen Aminosäure-Bausteine abhängt (135, 136). Die Aminosäuren wurden in der Folge in die beiden Klassen "Helix-Bildner" und "Nicht-Helixbildner" eingeteilt; diese Klassifizierung ist später durch die Gruppe "ß-Bildner" erweitert worden (siehe dazu Kap. III.4.). Als wichtigste Kriterien für die Tendenz, Helixstrukturen auszubilden, wurden sterische Faktoren, die sich aus der Wechselwirkung zwischen Seitengruppe und Kettengerüst ergeben, sowie Wechselwirkungen zwischen Peptidkette und Lösungsmittel erkannt (4); die gleichen Kräfte scheinen für die Ausbildung von ß-Strukturen entscheidend zu sein. Für die Faltung von Proteinen in die Tertiärstruktur kommen sog. weitreichende Wechselwirkungen hinzu (d.h. zwischen Aminosäuren, die in der Peptidkette weit voneinander entfernt liegen); die Bildung hydrophober Bereiche, wie im Myoglobin verwirklicht (137, 138), scheint eine treibende Kraft zu sein.

Die enge Verknüpfung zwischen Konformation und biologischer Aktivität eines Proteins war die wesentliche Triebfeder für die intensiven Konformationstudien an Polypeptiden in den vergangenen Jahren. Neben theoretischen Ansätzen (siehe dazu Kap. III.4.) wurden vor allem durch die Entwicklung neuer analytischer Untersuchungsmethoden in Verbindung mit ver-

besserten Synthesewegen die experimentellen Konformationsstudien an Polypeptiden in Lösung stark vorangetrieben. Während die Röntgenstrukturanalyse wertvolle Information über die Konformation von Proteinen im Festzustand liefert, dient zur Konformationsananlyse in Lösung zunächst die IR- und UV-Spektroskopie. Den größten Fortschritt brachte die Erschließung des konformationsempfindlichen UV-Bereichs bei ORD- und CD-Messungen, nachdem Moffitt die theoretischen Grundlagen für die Anwendung dieser Methoden geschaffen hatte (139, 140). Holzwarth und Doty konnten zeigen, daß eine eindeutige Unterscheidung zwischen α-Helix, ß-Konformation und ungeordneter Struktur eines Polypeptides in Lösung durch Messung des Zirkulardichroismus möglich ist (141). UV-Messungen unterhalb 200 nm haben diese Ergebnisse bestätigt (142). Schließlich stellt die Anwendung der hochauflösenden Kernresonanzspektroskopie eine weitere, äußerst wertvolle Methode zur Untersuchung der Konformation von Polypeptiden in Lösung dar (143). Aus der statistisch-mechanischen Behandlung von Konformationsübergängen wurden wichtige Erkenntnisse über den Mechanismus des sog. "Helix-coil"-Überganges, sowie über die Stabilität von Sekundärstrukturen gewonnen (144-146). Theoretische Arbeiten haben dabei zu einem realistischen, hilfreichen Modell zur Behandlung von Konformationsübergängen geführt (10, 147-151). Keine der angeführten Methoden liefert im Augenblick eine umfassende Information über die dreidimensionale Anordnung eines Proteins in Lösung; vielmehr ergänzen sich die verschiedenen Untersuchungsmethoden gegenseitig.

Die gegenwärtige Situation ist deshalb gekennzeichnet durch die Bestrebungen, alle angeführten experimentellen und theoretischen Methoden zum Studium der Konformation von Polypetpiden gleichzeitig heranzuziehen, um ein möglichst detailliertes Bild von den konformationsbildenden Kräften innerhalb eines Proteins zu erhalten. Dabei kommt dem engen Wechselspiel zwischen experimenteller und theoretischer Konforamtionsanalyse eine stetig wachsende Bedeutung zu.

Auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Konformationsuntersuchungen an Homooligopeptiden und an ACTH-Sequenzen wird dieser Weg beschritten.

2. Konformationsanalyse PEG-gebundener Peptide

2.1. Voraussetzungen

a) Allgemeines

Konformationstudien von synthetischen Peptiden sind vor allem in Lösung von großem Interesse, da sie Rückschlüsse zulassen über den Zusammenhang zwischen biologischem Wirkungsmechanismus und der Konformation des biologisch aktiven Peptids. Die Untersuchungen an Modellpeptiden werden dabei sowohl in organischem Medium als auch in Wasser durchgeführt: das organische Lösungsmittel imitiert dabei eine hydrophobe Umgebung des Peptids, die im biologischen System (z.B. in der Zellmembran) oder im Innern eines Proteins selbst (z.B. in der hydrophoben Tasche des Myoglobins) gegeben sein kann. Die wässrige Umgebung ist das Lösungsmittel, in dem die Proteine ihre biologische Aktivität ausüben. Der Einfluß des Lösungsmittels auf die Konformation eines Peptids ist inzwischen an vielen Beispielen demonstriert worden. Da nur wenige Peptide das für Konformationsuntersuchungen erforderliche Löslichkeitsverhalten zeigen, bietet die direkte Konformationsanalyse PEG-gebundener - und damit solubilisierter - Peptide große Vorteile:

- Die synthetischen Peptide können wegen der guten Löslichkeit von PEG in einer Vielzahl von Lösungsmitteln - z.B. TFE, Dioxan, $CHCl_3$, H_2O - untersucht werden.
- Durch den schnellen stufenweisen Aufbau nach der LPM können in kurzer Zeit eine Vielzahl von Modellpeptiden bzw. Peptidanalogen synthetisiert und ohne zusätzlichen Syntheseaufwand vermessen werden.

- Der Zusammenhang zwischen Kettenlänge, Schutzgruppen, Lösungsmittel, Primärsequenz und der Konformation kann systematisch untersucht werden.

Bevor Konformationsuntersuchungen an PEG-gebundenen Peptiden allgemeine Anwendung finden können, gilt es, folgende Fragen abzuklären:

1. Welchen Einfluß besitzt die PEG-Kette auf die Konformation des Peptids?
2. Stört die PEG-Kette die Anwendung der zur Konformationsanalyse verwendeten spektroskopischen Methoden?

Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen stellen einen Beitrag dar, diese Fragen zu beantworten.

b) Spektroskopische Eigenschaften von PEG

Da es bis heute keine Methode gibt, mit der die Konformation eines Proteins in Lösung direkt ermittelt werden kann, ist man auf eine Kombination verschiedener spektroskopischer Methoden angewiesen, von denen jede spezifische, voneinander unabhängige und oft sich ergänzende Informationen liefert. Die heute am häufigsten angewandten Untersuchungsmethoden sind: die Messung des Zirkulardichroismus (CD), die ^{1}H- bzw. ^{13}C-NMR-Spektroskopie, IR-, UV- und die Ramanspektroskopie. Für die Konformationsuntersuchung PEG-gebundener Peptide ist es nun wesentlich, welche Eigenschaften PEG bei der Anwendung dieser Methoden besitzt.

1. PEG zeigt keinen Cottoneffekt und ist im interessierenden Wellenlängenbereich optisch leer. Damit sind CD- und UV-Messungen PEG-gebundener Peptide möglich, wie inzwischen mehrfach gezeigt werden konnte.
2. Im ^{1}H-NMR-Spektrum besitzt PEG infolge der magnetischen Äquivalenz der CH_2-Protonen nur ein Singulett bei 3.45 ppm.

Dieses Singulett interferiert somit nicht mit den für die Konformationsuntersuchung von Peptiden relevanten α-CH- und NH-Protonenresonanzen, die bei 4.2 ppm bzw. 7.0 ppm liegen. Selbst das infolge von Akkumulation stark verbreiterte Singulett (Abb. 9) des PEG hat keinen Einfluß auf die α-CH-Resonanz des Tetra-L-Alanins bei 4.1 - 4.3 ppm.

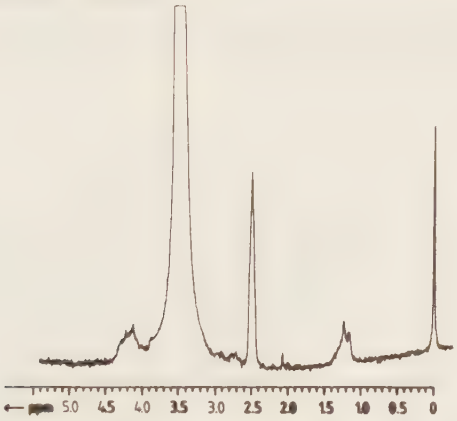


Abb. 9: ^{1}H-NMR-Spektrum H-$(Ala)_4$-PEG (Mol.-Gew. 6000) in DMSO (30 mg PEG-Peptid/ml; 30 scans).*

Durch Einstrahlung der Resonanzfrequenz kann außerdem der PEG-Peak herausfiltriert werden, sodaß das reine Peptidspektrum erhalten wird (152, 153). Gleiches gilt für die ^{13}C-Spektroskopie, wie Jung und Mitarb. bei Konformationsuntersuchungen an PEG-gebundenen Alamethicinanalogen gezeigt haben (153). Die Feststellung, daß evtl. an PEG gebundenes Wasser sich störend auf die α-CH-Resonanz bemerkbar macht, hat sich nicht bestätigt (154). Es wurde gezeigt, daß diese Beobachtungen auf Wasserspuren in den verwendeten Lösungsmitteln zurückzuführen sind.

---

* Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich Herrn Dr. K. Albert.

3. In Abb. 10 ist das IR-Spektrum von PEG, Mol.-Gew. 10000 abgebildet, wobei die für die Konformationsuntersuchungen von Peptiden wichtigen Frequenzbereiche gekennzeichnet sind. Daraus geht hervor, daß PEG in den am meisten interessierenden Bereichen, nämlich im Absorptionsbereich der Amid-I-, Amid-II und Amid-V-Bande keine Absorption zeigt. Somit läßt sich die an Bedeutung zunehmende IR-Untersuchung auf PEG-gebundene Peptide in Lösung und im Festzustand anwenden.

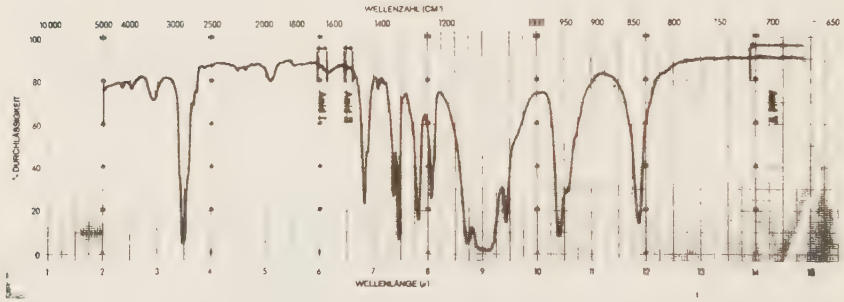


Abb. 10: IR-Spektrum von PEG 10000 mit den Absorptionsbereichen der Amid-I-(1630-1685 cm^{-1}) Amid-II-(1515-1550 cm^{-1}) und Amid-V-Bande (600-720 cm^{-1})

4. Durch die Möglichkeit, die Konformation von Peptiden in wässriger Lösung zu untersuchen, hat die Raman-Spektroskopie bereits heute breite Anwendung gefunden (155). Auch hier besitzt PEG in den interessierenden Bereichen keine störenden Absorptionsbanden, sodaß diese Methode ebenfalls auf PEG-Peptide anwendbar ist.

Insgesamt kann festgestellt werden, daß prinzipiell alle heute verwendeten analytischen Untersuchungsmethoden zur Konformationsbestimmung direkt auf PEG-gebundene Peptide angewandt werden können. Allerdings muß, besonders was die NMR-Spektroskopie betrifft, noch einige Erfahrung im Umgang mit PEG-Peptiden gesammelt werden.

2.2. Einfluß der PEG-Kette auf die Konformation des Peptids

Beim Studium der Konformation von solubilisierten Peptiden ging man bisher von der Annahme aus, daß die verwendeten Schutzgruppen keinen Einfluß auf die Konformation des Peptids besitzen. Es gibt inzwischen viele Hinweise, die Zweifel an dieser Annahme aufkommen lassen. Wie bereits erwähnt, scheint vor allem das N-terminale Ende auf die Stabilität einer bestimmten Konformation einen entscheidenden Einfluß zu besitzen (93). Inwiefern sich die bei der LPM verwendete C-terminale makromolekulare Schutzgruppe störend auf die Konformation des Peptids auswirkt, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Eine systematische Untersuchung an Oligo-[L-Glu]-PEG-Estern hat ergeben, daß PEG keinerlei störenden Einfluß auf die Ausbildung einer α-Helixstruktur besitzt (156): Vergleichende CD-Messungen an Oligo-[L-Glu]-Methyl- bzw. PEG-Estern ergaben identische Spektren in allen Synthesestufen bis zu einer Kettenlänge von 20 Aminosäureresten, bei der ca. 60% Helixbildung gefunden wurde. Auch bei sequentiellen Peptiden konnte bisher kein störender Einfluß von PEG nachgewiesen werden (94, 157).

Da es sich bei diesen Beispielen ausschließlich um die Ausbildung einer α-Helix handelt (die bekanntlich durch intramolekulare Wechselwirkungen, z.B. Wasserstoffbrückenbildung, stabilisiert wird), blieb die Frage offen, ob PEG-gebundene Peptide auch die zur Bildung einer ß-Struktur notwendigen intermolekularen Wasserstoffbrücken auszubilden vermögen.

Dazu ist eine gegenseitige freie Durchdringung der PEG-Knäuel notwendig. Über das Verhalten von Polymerknäueln in konzentrierten Lösungen gibt es heute zwei sich widersprechende Theorien: Nach dem sog. Zellenmodell von Vollmert findet bei Erhöhung der Konzentration eine Kontraktion der Knäuel statt, sodaß eine gegenseitige Durchdringung verhindert wird, und die Makromoleküle als einzelne Individuen vorliegen (158) (Abb. 11 a). Nach dieser Theorie ist die Ausbildung intermolekularer Strukturen unmöglich. Demgegenüber steht das Flory-Modell (159), das eine gegenseitige Durchdringung der Polymermoleküle annimmt. Nach dieser Vorstellung besitzen die Knäuel in verdünnter Lösung (im θ-Zustand) die gleichen Dimensionen wie im amorphen, unverdünnten Zustand, sodaß eine ungehinderte Durchdringung der Moleküle stattfindet (Abb. 11 b). Neueste Untersuchungen mit Hilfe der Neutronenstreuung an amorphen Polymeren haben dieses Modell eindrucksvoll bestätigt (160, 161).

Abb. 11: Zellenmodell von Vollmert (a) und Flory-Modell (b) für konzentrierte Polymerlösungen

Die in dieser Arbeit synthetisierten hydrophoben Oligopeptide sind hervorragend geeignet zur weiteren Klärung dieses Problems beizutragen, da alle drei Oligomerreihen zur Ausbildung stabiler ß-Strukturen neigen.

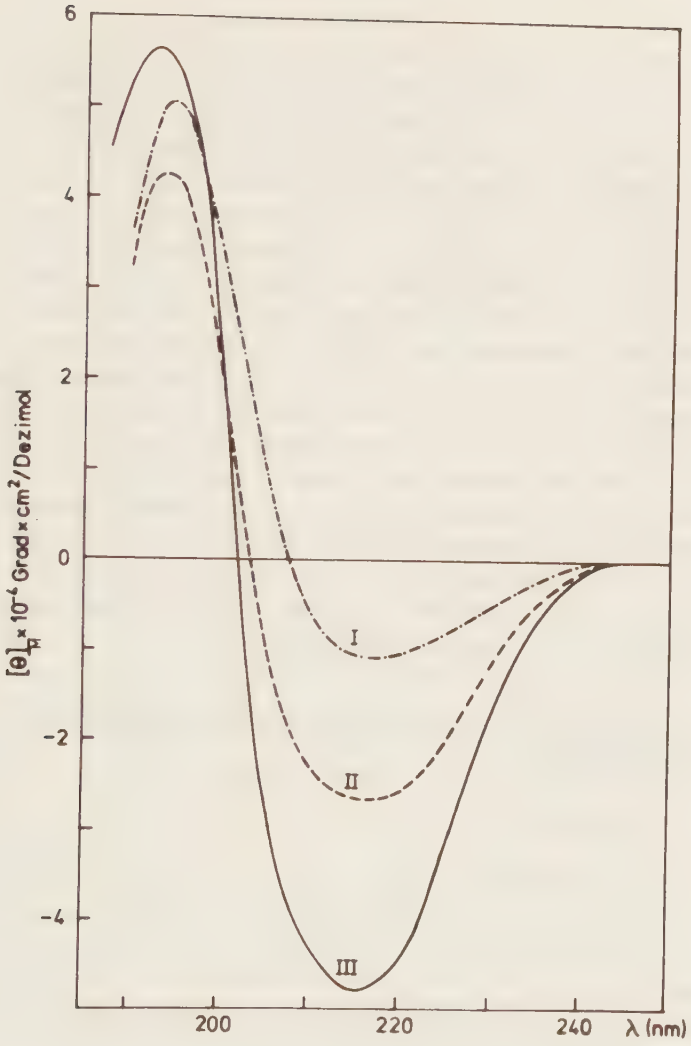


Abb. 12: CD-Spektren von $H(L\text{-}Ala)_8$-PEG(I), $BOC(L\text{-}Val)_8$-PEG(II) und $BOC(L\text{-}Ile)_8$-Gly-PEG(III), ($c=10^{-3}$M in TFE)

Abb. 12 zeigt die CD-Spektren von $H(L\text{-}Ala)_8$-PEG, Mol.-Gew. $6 \cdot 10^3$, $BOC(L\text{-}Val)_8$-Gly-PEG, Mol.-Gew. $2 \cdot 10^4$ und $BOC(L\text{-}Ile)_8$-Gly-PEG, Mol.-Gew. $2 \cdot 10^4$ in TFE. Die charakteristischen CD-Daten (negativer Cottoneffekt bei 216 nm, Nulldurchgang bei 202, 205 bzw. 207 nm, pos. Cottoneffekt bei 193 bzw. 194 nm) sprechen eindeutig für das Vorliegen von ß-Strukturen. Da diese Strukturen durch Verdünnung zerstört werden können (s. unten), handelt es sich um eine intermolekulare, vermutlich antiparallele ß-Struktur. Dieses Ergebnis ist für die Konformationsuntersuchung PEG-gebundener Peptide äußerst wichtig: Die Anwesenheit der makromolekularen PEG-Estergruppe hat keinen Einfluß auf die Ausbildung einer intermolekularen ß- Strukturvon Peptiden. Die CD-Spektren sind mit denen der entsprechenden niedermolekularen Peptidester identisch (100, 101); diese Aussage wird durch alle weiteren CD-Untersuchungen bestätigt (s. anschließende Kap.). Das Verhalten von PEG-Peptiden in relativ konzentrierten Lösungen zeigt, daß das Flory-Modell einer gegenseitigen Durchdringung der Polymerknäuel die Verhältnisse richtig wiedergibt.

3. Ergebnissse und Diskussion der Konformationsuntersuchungen

3.1. Oligopeptide

3.1.1. CD-Untersuchungen

a) Oligo-L-Alanin

Allgemeines:
Über Oligo-[L-Ala] liegen sehr umfassende Konformationsuntersuchungen vor (90-94, 97, 101, 163). Da das Peptid schwer löslich ist, wurden die meisten Studien an solubilisierten Ala-Blöcken durchgeführt. Die verschiedenen Autoren kamen dabei zu recht widersprüchlichen Ergebnissen: Gratzer und Doty (90) fanden beim Studium von Blockcopolymeren einen

α-Helixgehalt des Poly-(L-Alanin)-Blocks von 92% bei pH 7 (berechnet aus b_o-Werten aus ORD-Messungen). Ingwall et al. (91) erhielten für Dekaalanin, das durch Poly-(L-Lysin)-Blöcke solubilisiert war, keinerlei Hinweis auf eine α-Helixstruktur in Wasser. Die erhaltenen Spektren deuteten vielmehr auf das Vorliegen einer "random coil"-Struktur hin. Schließlich fanden Goodman et al. (92), daß Cooligomere von L-Alanin und γ-Methyl-L-Glutaminsäureester weitgehend in helikaler Form vorliegen. Erst bei Verwendung niedermolekularer solubilisierender Schutzgruppen zeigte sich, daß Oligo-[L-Ala]-Derivate auch in der ß-Struktur vorliegen können (93). Dies schienen Berechnungen von Gibson und Scheraga (164) zu bestätigen, die auf Grund von Konformationsenergieberechnungen eine ß-Struktur für Dekaalanin in Wasser voraussagten. Allerdings war es nicht gelungen, die Konformation des Dekaalanins experimentell zu bestimmen, da eine Solubilisierung nur bis zum Nonapeptid möglich war (92). Außerdem besaßen alle bis dahin durchgeführten Untersuchungen den Nachteil, daß beide Kettenenden blockiert waren. Durch Verwendung des C-terminalen PEG-Esters war es somit erstmals möglich, L-Dekaalanin aufzubauen und in jeder Stufe mit und ohne N-terminale Schutzgruppe in Wasser und organischen Lösungsmitteln zu untersuchen (94).

Ergebnisse:

In Abb. 13 sind die CD-Spektren von H-$(Ala)_n$-PEG, Mol.-Gew. 6000 in TFE dargestellt. Die niedrigen Stufen des Oligopeptids ergeben noch kein charakteristisches CD-Spektrum. Die Stufen 5 und 6 besitzen eine ungeordnete Struktur. Das Heptapeptid deutet bereits auf geringe Anteile einer ß-Struktur hin, liegt aber noch vorwiegend ungeordnet vor. H-$(L\text{-}Ala)_8$-PEG liegt dagegen in einer reinen ß-Struktur vor (Cottoneffekte bei 196 nm (+) bzw. 218 nm (-) und Nulldurchgang bei 210.5 nm). Die CD-Daten stimmen mit denen anderer Polypeptide mit ß-Struktur sehr gut überein (93, 97, 163).

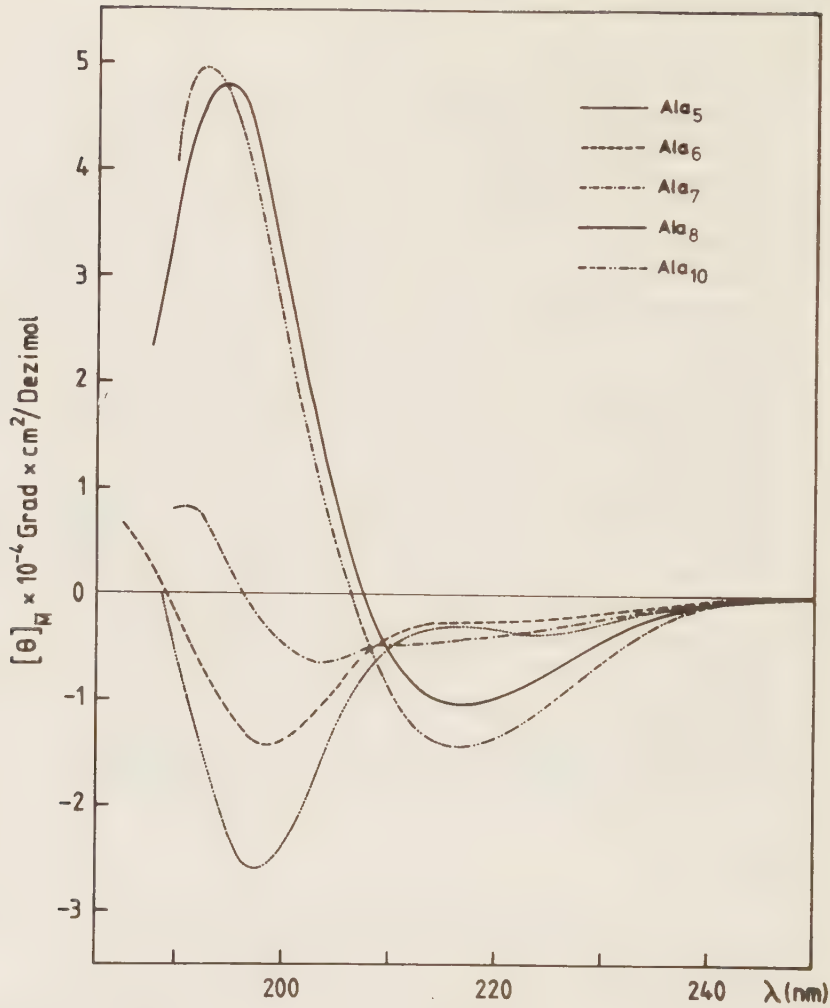


Abb. 13: CD-Spektren von H-$(Ala)_n$-PEG, Mol.-Gew. 6000 in TFE ($c = 10^{-3}$M)

Auch das Nona-, bzw. Dekaalanin besitzen eindeutig ß-Struktur, wobei die molaren Elliptizitäten bis zum Dekapeptid ständig zunehmen (vgl. Tab. 4). Durch das Vorliegen intermolekularer Wasserstoffbrücken sind diese Strukturen konzentrationsabhängig, d.h. die ß-Struktur wird bei Verdünnung zerstört. Die Konzentration, bei der eine partielle Zerstörung der ß-Struktur eintritt, liegt bei ca. 0.1 mg Peptid/ml.

Der prozentuale Anteil an ß-Struktur kann aus den CD-Kurven für eine reine ß- bzw. ungeordnete Struktur abgeschätzt werden. Dies wird durch CD-Messungen bestätigt, bei denen verschiedene Anteile eines "random coil"-Peptids mit einem Peptid das ß-Struktur besitzt, vermischt werden. Daraus kann geschlossen werden, daß sich die beiden vorliegenden Konformationen nicht gegenseitig beeinflussen und sich die Elliptizitätswerte tatsächlich addieren. Aus den errechneten CD-Kurven geht hervor, daß Mischungen von ungeordneten und ß-Strukturen, wie sie beispielsweise bei einer partiellen Zerstörung der ß-Struktur durch Verdünnung auftreten, ein sehr ähnliches Spektrum ergeben können wie partiell helikale Strukturen.

Interessant ist nun ein Vergleich der CD-Messungen mit den an niedermolekular solubilisierten Oligo-Alaninestern gewonnenen Ergebnissen: Die CD-Daten decken sich in allen Stufen (bis n = 9) mit den von Goodman et al. für die Oligomerreihe Z-(L-Ala)$_n$-MO (MO = Morpholino) erhaltenen Werten (93). Daraus läßt sich schließen, daß sich PEG vollkommen analog zu niedermolekularen C-terminalen Schutzgruppen verhält.

Die N-BOC-geschützten Derivate besitzen im Helix fördernden Lösungsmittel TFE helikale Konformation in den Stufen n = 9 und n = 10 (Abb. 14). Die Ausbildung der Helixstruktur beginnt bei Stufe 7 und beträgt beim Dekapeptid ca. 25%.

Oligomer	n-π*-Bande		π-π*-Bande		Null durchgang (nm)	Zugeordnete Struktur
	Lage (nm)	$\Theta_m \times 10^{-3}$	Lage (nm)	$\Theta_m \times 10^{-3}$		
Boc-(L-Ala)$_9$-OPEG[a]	220	- 30.7	203.5/188	- 84.4/+157.3	197.8	Helikaler Charakter
Boc-(L-Ala)$_{10}$-OPEG[a]	217	-132.5	206/190	-177.9/+232.3	197.5	Helikaler Charakter
H-(L-Ala)$_9$-OPEG[a]	217.5	- 80.9	194	+ 291.1	206.8	ß-Konformation
H-(L-Ala)$_{10}$-PEG[a]	215.8	-141.5	193.5	+ 583.7	207.5	ß-Konformation
H-(L-Ala)$_{10}$-OPEG[b]	218	- 16.4	196	- 94.7	210.5	ß-Konformation

[a] In F_3EtOH (0.04 mg Peptid/ml)

[b] In H_2O (0.2 mg Peptid/ml)

Tab. 4: Charakteristische CD-Daten von (L-Ala)$_9$-OPEG und (L-Ala)$_{10}$-OPEG, Mol.-Gew. 6000

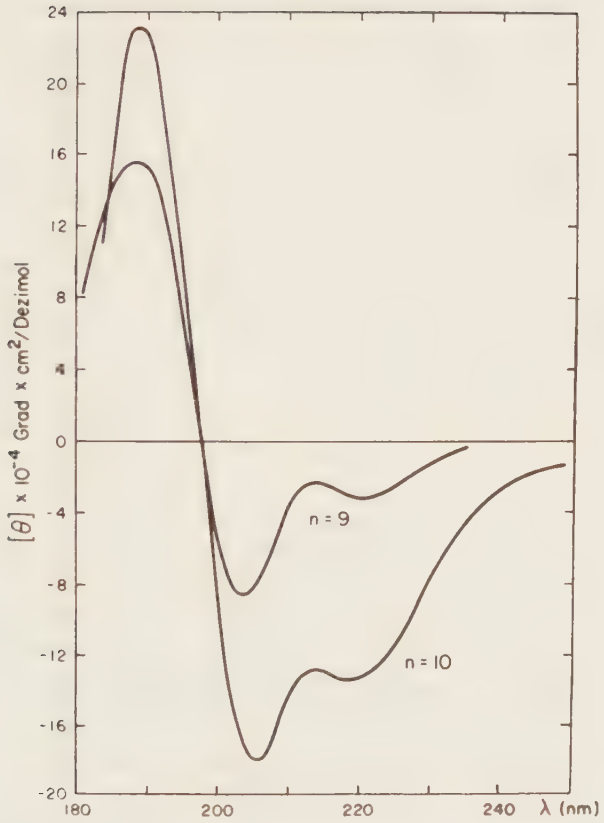


Abb. 14: CD-Spektren von BOC-$(Ala)_n$-OPEG in F_3EtOH
(Mol.- Gew. von PEG = 6000); c = 0,04 mg Peptid/ml

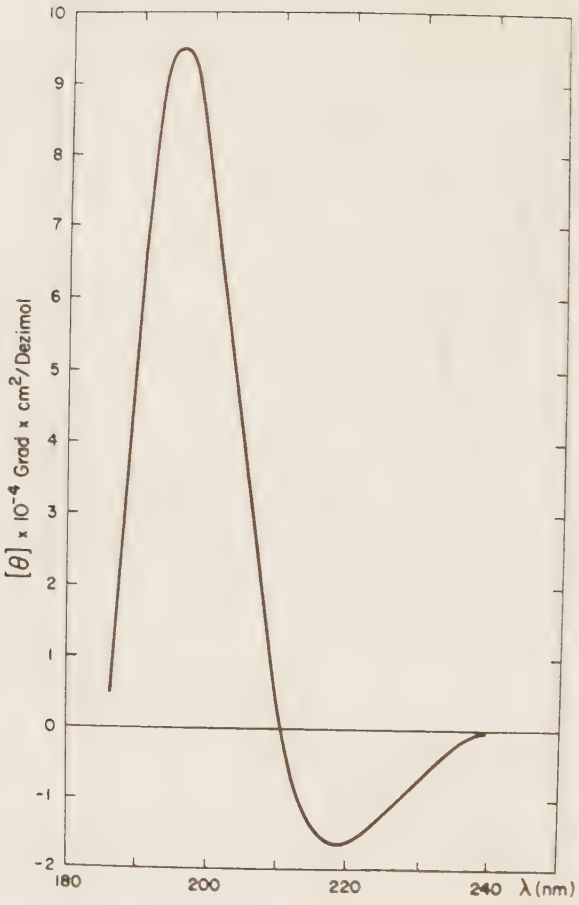


Abb. 15: CD-Spektrum von H-$(Ala)_{10}$-OPEG in Wasser (Mol.- Gew. von PEG = 6000); c = 0,2 mg Peptid/ml

Durch die solubilisierende Wirkung der PEG-Kette konnten die Oligomere erstmals in reinem Wasser vermessen werden. Abb. 15 zeigt das CD-Spektrum von H-$(Ala)_{10}$-PEG in H_2O. Die Lage der Cottoneffekte sprechen wiederum eindeutig für das Vorliegen einer reinen ß-Konformation (Tab. 4). Die Tatsache, daß selbst bei relativ hoher Verdünnung noch ß-Struktur vorliegt, zeigt, daß PEG keine destabilisierende Wirkung auf diese Konformation ausübt. Die Ergebnisse, die für $(L\text{-}Ala)_{10}$ sowohl in Wasser als auch in TFE ß-Struktur ergeben haben, bestätigen somit die von Gibson und Scheraga (164) auf Grund von Konformationsenergieberechnungen gemachten Vorhersagen während die theoretischen Ergebnisse von Hopfinger (8), der ein etwas höheres statistisches Gewicht für eine α-Helixstruktur erhielt, durch das Experiment widerlegt werden.

b)Oligo-L-Valin

In Abb. 16 sind die CD-Spektren von BOC-$(L\text{-}Val)_n$-Gly-PEG, Mol.-Gew. $2 \cdot 10^4$ für n = 3,5,6,8 in TFE dargestellt. Die Oligomeren bis zu Kettenlängen von n = 4 besitzen keine charakteristischen CD-Kurven. Ab n = 6 zeichnet sich die Ausbildung ß-artiger Strukturen ab. Geht man erneut von der Annahme aus, daß ein gleichzeitiges Vorliegen einer ß-Struktur neben einer α-Helixstruktur bei diesen Kettenlängen auszuschließen ist (88) (auch bei größeren Kettenlängen ist ein direkter Übergang zwischen diesen Strukturen aus thermodynamischen Gründen unmöglich, s.o.), dann liegt für n = 6 und n = 7 eine Mischung aus ungeordneter und ß-Struktur vor, die im Gleichgewicht ineinander übergehen. Aus den errechneten CD-Kurven, die aus der Überlagerung von "random coil"- und α-helikalen Strukturen (Abb. 17 a), bzw. von "random coil"- und ß-Strukturen (Abb. 17 b) resultieren (87), ergibt sich für n = 6 ein Anteil an ß-Struktur von unter 20%. Ähnlich wie im Falle von Oligoalanin tritt bei einer kritischen Kettenlänge ein drastischer Konformationswechsel ein.

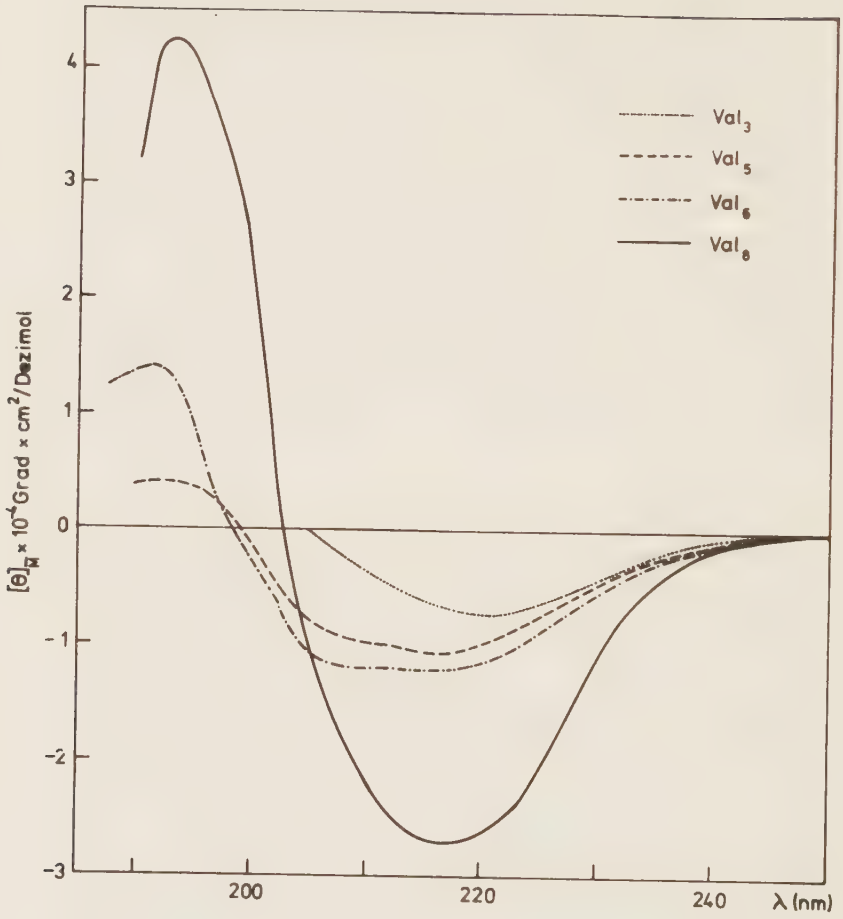


Abb. 16: CD-Spektrum von BOC-$(L\text{-Val})_n$-Gly-PEG, Mol.-Gew. 2×10^4 für n = 3,5,6,8 in TFE ($c = 10^{-3}$ M)

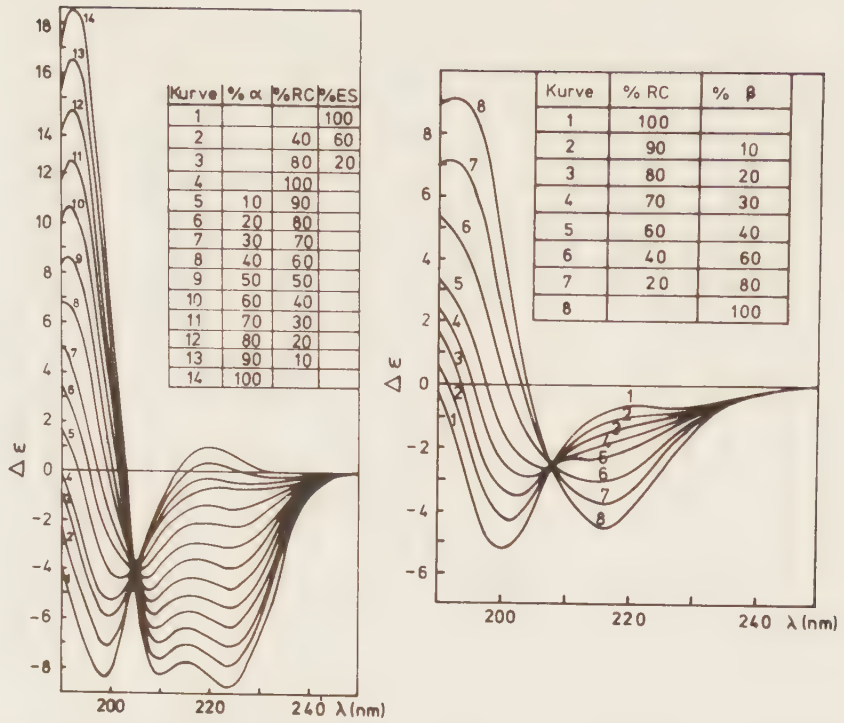


Abb. 17: Berechnete CD-Kurven für verschiedene Anteile an Sekundärstruktur; a: α-Helix, b: ß-Struktur (87)

Im Falle von Oligo-[Val] liegt dieser Übergang bei n = 7; das Heptamer besitzt bereits vorwiegend ß-Struktur (ca. 80%). Für das Oktapeptid schließlich wird eine reine ß-Struktur gefunden (Cottoneffekte bei 218 nm (-), 197 nm (+) und Nulldurchgang bei 205 nm). Die CD-Daten der PEG-gebundenen Oligomere stimmen mit den von Toniolo und Goodman an Methylestergeschützten Derivaten gefundenen Werten (166) gut überein. Geringe Abweichungen der Elliptizitätswerte sind auf Konzentrationseffekte zurückzuführen oder liegen innerhalb der Messgenauigkeit der CD-Messung. CD-Messungen an N-ungeschützten Derivaten ergaben hier keine wesentlichen Unterschiede der CD-Kurven. Diese Ergebnisse sind ein weiteres Indiz dafür, daß PEG die Ausbildung von intermolekularen ß-Strukturen nicht stört.

c) Oligo-L-Isoleucin

Wegen der hydrophoben Seitengruppen und dem ausgeprägten Energieminimum für eine ausgestreckte Konformation wurden für Oligo-[L-Ile] besonders stabile ß-Strukturen erwartet. Erste Untersuchungen von Toniolo et al. (167) scheinen dies zu bestätigen. Eine genaue Konformationsanalyse dieses präparativ schwer zugänglichen Peptids, insbesondere Stabilitätsuntersuchungen der Sekundärstruktur, waren deshalb von großem Interesse.

Bei zunehmender Kettenlänge (n = 2-5) nimmt die Intensität der Cottoneffekte in den Bereichen von 210 - 220 nm und 190 - 200 nm kontinuierlich zu (Abb. 18).
Die Spektralbande des π-π^* Übergangs des Amidchromophors erfährt eine geringe Rotverschiebung. Die Veränderungen des spektralen Musters der niederen Oligomere sind analog zu denen der oben untersuchten Oligomere.

Beim Hexamer tritt eine starke Zunahme der molaren Elliptizität bei 197 nm und 216 nm ein. Die charakteristischen CD-Daten deuten bereits beim Hexamer auf das Vorliegen einer

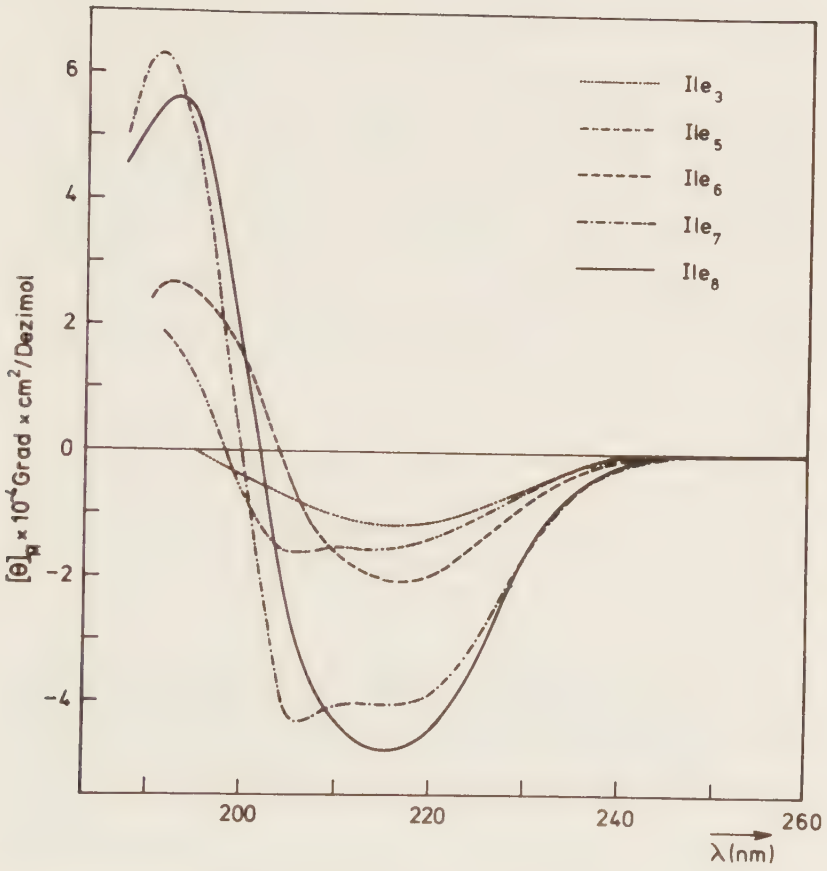


Abb. 18: CD-Spektren von BOC-(L-Ile)$_n$-Gly-PEG, Mol.-Gew. 2.10^4 für n = 3,5,6,7,8 in TFE ($c = 10^{-3}$ M)

partiellen ß-Struktur hin, die stark konzentrationsempfindlich ist. Der von Toniolo et al. (167) beobachtete starke negative Cottoneffekt bei 197 nm für das Hexamer, der auf das Vorliegen "assoziierter, gefalteter Strukturen" hindeuten soll, wurde hier nicht beobachtet. Obwohl die Konzentrationen nicht exakt übereinstimmen, scheint inzwischen einiges auf ein Artefakt bei der CD-Kurve von Toniolo et al. hinzudeuten (168). Die CD-Spektren des Hepta- bzw. Oktamers unterscheiden sich - ähnlich wie bei Oligo-[Val] - vollständig von denen der niedrigen Stufen. Der Kurvenverlauf spricht eindeutig für das Vorliegen einer ß-Struktur, wobei beim Heptapeptid bei der vorliegenden Konzentration noch geringe Anteile an "random coil"-Struktur vorhanden sind. Im Unterschied zur Oligo-Ala-Serie tritt hier der Übergang "random coil" ⟶ ß-Struktur bei kürzerer Kettenlänge ein. Dies deutet bereits auf eine höhere Stabilität der ß-Struktur hin. Verdünnungsreihen haben gezeigt, daß die Faltblattstruktur des Hexa- bzw. Heptamers wesentlich leichter zerstörbar ist als die des Oktapeptids. BOC-$(Ile)_8$-Gly-PEG besitzt selbst bei einer Verdünnung um einen Faktor von 1:40 noch überwiegend ß-Struktur (Konz. < 0.01 mg/ml). Diese ungewöhnliche Stabilität des Oktameren läßt sich nur durch Ausbildung einer intramolekularen ß-Struktur ("cross-ß-structure") erklären: Nach diesem Modell liegt eine Faltstelle im Molekül vor ("ß bend"), sodaß intramolekulare Wasserstoffbrücken ausgebildet werden, die durch Verdünnung nicht zerstört werden können (Abb. 19).

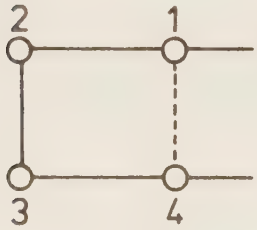


Abb. 19: Modell eines "ß turn" (ß-bend)

Dagegen liegen beim Hexa-, bzw. Heptapeptid eindeutig assoziierte Strukturen vor. Von den hier untersuchten Oligomeren besitzt Oligo-[Ile] die stabilste ß-Struktur.

Im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Autoren ließen sich die ß-Strukturen der Oligomere durch Verdünnung nicht vollständig zerstören. Auffallend war die Tatsache, daß stets ein Restanteil ß-Struktur erhalten blieb, der bei allen untersuchten Reihen ungefähr gleich groß war. Dieser Effekt wird möglicherweise durch den bifunktionellen Charakter von PEG verursacht: Neben assoziierten, intermolekularen Strukturen liegen im Gleichgewicht mit Sicherheit auch Strukturen vor, bei denen Peptidketten des gleichen PEG-Moleküls dimerisieren:

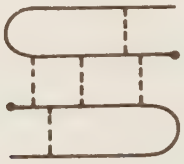
Da solche Strukturen hinsichtlich des Peptidanteils zwar intermolekular, bezüglich PEG jedoch intramolekular sind, tritt vermutlich bei Verdünnung keine Dissoziation und somit keine Zerstörung der Sekundärstruktur ein. Falls diese Hypothese zutrifft, dürfte dieser Effekt bei Verwendung von monofunktionellem PEG - das bei der LPM bereits verschiedentlich als C-terminale Schutzgruppe benützt wird - nicht beobachtet werden.

3.1.2. ^{1}H-NMR-Studien

Nachdem sich gezeigt hatte, daß NMR-Messungen an PEG-gebundenen Peptiden durchgeführt werden können, wurden einige NMR-Studien an Oligo-[L-Ala]-PEG-estern durchgeführt.

Hier ging es vor allem darum, zu zeigen, daß der bei niedermolekularen Oligo-Ala-Derivaten gefundene α-CH-Doppelpeak nicht auf Polydispersität der Oligomere zurückzuführen ist, sondern vielmehr seine Ursache - wie von Goodman erstmals festgestellt (169) - in der Ausbildung einer Sekundärstruktur mit unterschiedlicher Solvatation der α-CH- bzw. NH-Protonen hat. Auf Grund detaillierter NMR-Studien an verschiedenen Oligoalaninderivaten schlägt Goodman folgendes Modell vor, das mit der Existenz eines Doppelpeaks der α-CH-Protonen konsistent ist:

Beim Tetrapeptid erfolgt in hoher Konzentration eine Seite-an-Seite Aneinanderlagerung zweier gefalteter Peptidketten. Die Faltung der Tetramere ist gleichbedeutend mit dem Vorhandensein eines sog. "ß turn". Nach diesem Modell existieren intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken, wobei letztere bei Verdünnung zerstört werden. Der Doppelpeak hat die Ursache in der unterschiedlichen Solvatation der beiden N-, bzw. C-terminalen α-CH-Protonen infolge Dimerisierung.



Bei den höheren Oligomeren tritt eine erhebliche Stabilisierung der Sekundärstruktur ein. Dies drückt sich darin aus, daß der Doppelpeak trotz starker Verdünnung erhalten bleibt. Auch hier schlägt Goodman als Modell gefaltete Ketten mit intramolekularen Wasserstoffbrücken vor. Diese gefalteten Ketten stehen in schnellem Gleichgewicht mit offenkettigen Strukturen, die bei starker Verdünnung bevorzugt vorliegen.

Der Doppelpeak hat hier seinen Ursprung in der unterschiedlichen Solvatation interner und terminaler Aminosäurereste, wobei eine Aggregation verschiedener Moleküle auszuschließen ist (Die Messungen wurden unter Zugabe von 1-3% TFA durchgeführt, wodurch Aggregation verhindert wird).

Die Untersuchungen von Goodman et al. (169) lassen die Frage offen, ob die solubilisierenden, niedermolekularen Schutzgruppen nicht einen entscheidenden Einfluß auf die Entstehung dieser gefalteten Strukturen in DMSO bzw. $CDCl_3$ besitzen oder sogar das beobachtete Doppelpeakphänomen die Ursache im Vorhandensein dieser N- und C-terminalen Schutzgruppen selbst hat. Beide Möglichkeiten sind diskutiert worden. Die hier durchgeführten vorläufigen Untersuchungen zeigen, daß die entsprechenden Oligo-[L-Ala]- PEG-Ester ebenfalls das Phänomen des α-CH-Doppelpeaks zeigen und ähnliche Verschiebungen aufweisen, wie die von Goodman verwendeten Derivate (Abb. 20); dieses Ergebnis erhärtet das von Goodman vorgeschlagene Modell zur Erklärung des Doppelpeakeffekts.

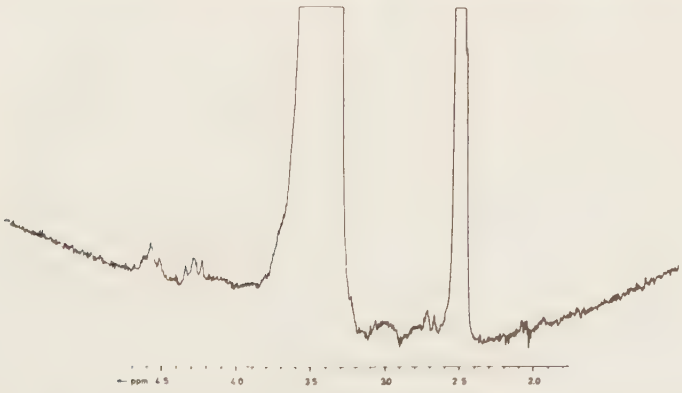


Abb. 20: ^{1}H-NMR-Spektrum von H(Ala)$_8$-PEG (Mol.-Gew. 6000) in DMSO (30 mg PEG-Peptid/ml; 163 scans)

3.1.3. Untersuchungen an PEG-Oligopeptiden im Festzustand

Aus einem Vergleich der Konformationen eines Peptids in Lösung und im Festzustand können wertvolle Rückschlüsse über die Bedeutung der intermolekularen Kräfte gegenüber den - in Lösung dominierenden - intramolekularen Kräften für die Konformation einer Peptidkette gewonnen werden. So ist heute die Frage noch ungeklärt, ob sich die Konformation eines Proteins beim Übergang in den Festzustand verändert. Hinsichtlich der Relevanz von Konformationsuntersuchungen mittels Röntgenbeugung ist dieses Problem von grundlegender Bedeutung.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen an PEG-gebundenen Homooligopeptiden waren folgende Fragen von Interesse:

- Bleibt die in Lösung gefundene intermolekulare ß-Struktur auch im Festzustand erhalten?
- Wie wirkt sich eine Sekundärstruktur des Peptids auf das Kristallisationsverhalten von PEG aus?

Aus den Vibrationsbanden der Amidbindungen im IR-Spektrum lassen sich wesentliche Informationen über die Konformation eines Peptids ableiten: Vor allem die Banden bei 1650 cm^{-1} (Amid-I-Bande) und bei ca. 700 cm^{-1} (Amid-V-Bande) stellten sich als äußerst empfindlich gegenüber Änderungen der Konformation des Peptids heraus. Abb. 21 zeigt das IR-Spektrum von $H(Ile)_8$-Gly-PEG, Mol.-Gw. $2 \cdot 10^4$. Die starken Absorptionsbanden bei 1650 cm^{-1} und 720 cm^{-1} deuten auf das Vorliegen einer ß-Struktur hin. Die schwache Bande bei 1690 cm^{-1} wird der Amid-I-Vibration von Polypeptiden in antiparalleler ß-Struktur zugeordnet (194). Da es sich bei der vorliegenden Probe um ein N-ungeschütztes Oligomer handelt, läßt sich diese Bande eindeutig interpretieren. Aus dem vorliegenden Spektrum kann somit geschlossen werden, daß das PEG-geschützte Oktapeptid auch im Festzustand in einer ß-Struktur

vorliegt, wobei die Assoziation durch eine antiparallele Anordnung der Ketten zustande kommt (170). Für das Dimere wird eine ungeordnete Struktur gefunden, während die Stufen 3 - 7 in Mischungen von ß-Struktur und ungeordneten Strukturen vorliegen.

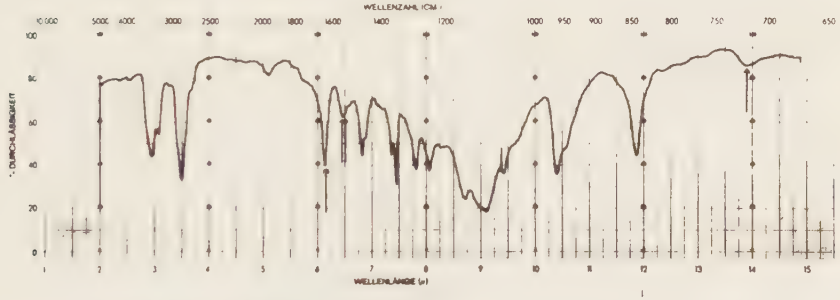


Abb. 21: IR-Spektrum von $H(Ile)_8$-Gly-PEG

Aus Röntgenweitwinkelstreuungen kann der Kristallisationsgrad einer polymeren Verbindung ermittelt werden (171). Bisherige Untersuchungen an PEG-gebundenen Peptiden haben ergeben, daß bei wachsender Kettenlänge des Peptids der Kristallisationsgrad des PEG langsam abnimmt (vgl. Abb. 8). Die Tatsache, daß die Reflexe im Röntgendiagramm von PEG-Peptiden und reinem PEG unverändert sind und keine neuen Reflexe erscheinen, läßt den Schluß zu, daß das Kristallgitter des PEG unverändert bleibt, und, daß der Peptidanteil amorph vorliegt.

Nachdem sich aus den IR-Untersuchungen ergeben hat, daß Oligo-[L-Ile]-Gly-PEG auch im Festzustand Sekundärstruktur (ß-Konformation) besitzt, war zu prüfen, ob sich im Röntgendiagramm irgendwelche Effekte ergeben. In Abb. 22 ist das röntgenographische Phasendiagramm von BOC-$(Ile)_8$-Gly-PEG, Mol.-Gew. 2.10^4, abgebildet. Neben den für PEG typischen Reflexen bei $\Theta = 19.1°$ und $\Theta = 23.2°$ tritt ein zusätzlicher Reflex bei $\Theta = 17.95°$ auf.

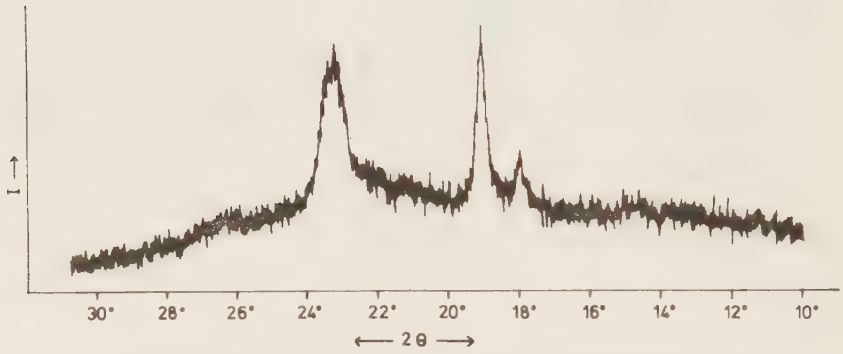


Abb. 22: Röntgenographisches Phasendiagramm von BOC-$(Ile)_8$-Gly-PEG (Mol.-Gew. 2.10^4)

Dieser, erstmals beobachtete, Reflex muß vom Peptidanteil im Kristallgitter herrühren. Nach dem für teilkristalline PEG-Peptide vorgeschlagenen Zweiphasenmodell (37) sind folgende Anordnungen denkbar, bei denen die Peptidketten assoziiert vorliegen. Beide Modelle sind mit den IR-Daten vereinbar. Da der Peptidanteil nur ca. 10% des Gesamtmole-

kulargewichts beträgt, ist die relativ geringe Intensität des Peptidreflexes durchaus zu erwarten. Die verhältnismäßig große Halbwertsbreite des Peaks läßt auf eine unregelmäßige Anordnung der Peptidketten schließen. Da noch keine weiteren Daten vorliegen, kann nicht abgeleitet werden, ob die Lage des Reflexes eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Sekundärstrukturen der Peptidkette zuläßt.

3.1.4. Schlußbetrachtung

Die vorliegenden Untersuchungen ergeben folgendes Bild:

1. Die Anwesenheit der makromolekularen Schutzgruppe wirkt sich nicht störend auf die Ausbildung von ß-Strukturen aus. Die CD-Studien deuten auf eine freie Durchdringung der PEG-Knäuel hin. Durch Bildung intramolekular assoziierter ß-Strukturen scheinen die Stabilitäten PEG-gebundener Peptide gegenüber niedermolekularen Peptidestern erhöht. Dieser störende, in der Bifunktionalität des verwendeten PEG begründete Effekt kann durch Verwendung von monofunktionellem PEG ausgeschlossen werden. Für die direkte Konformationsuntersuchung PEG-gebundener Peptide ist deshalb PEG mit nur einer funktionellen Gruppe vorzuziehen.

2. Alle heute zur Konformationsuntersuchung herangezogenen Methoden lassen sich auf PEG-Peptide anwenden. Bei NMR-Studien muß wegen der Erhöhung der Viskosität der Lösungen durch die polymere Schutzgruppe bei relativ niedrigen Konzentrationen gemessen werden. Die durch Aggregation der Peptidketten verursachte Schwerlöslichkeit kann durch Zusatz von 1% TFA aufgehoben werden.

3.2. ACTH-Sequenzen

3.2.1. Bisheriges Wissen über die Konformation von ACTH

Trotz der Bedeutung von ACTH ist über seine Konformation bis heute nur wenig bekannt. Dies hat verschiedene Ursachen: Zum einen liegen noch keine röntgenographischen Untersuchungen vor, die die umfassendste Information liefern könnten. Zum anderen scheint ACTH ein relativ flexibles Molekül zu sein, in dem größere Bereiche einer Sekundärstruktur fehlen. Die bisherigen Untersuchungen ergeben ein zum Teil widersprüchliches Bild: Die vorgeschlagenen Modelle reichen von der Annahme einer reinen "random coil"-Struktur bis zu einer partiellen α-Helixkonformation. Squire and Bewley (172) fanden auf Grund von ORD-Messungen, daß der Helixgehalt in ACTH ca. 10-15% beträgt. Timasheff (173) und Gratzer (174) kamen anhand von CD-Messungen an ACTH und ß-MSH zum Schluß, daß der Helixgehalt nur sehr gering sein kann. Li (175) fand durch Deuteriumaustauschexperimente, daß keine, bzw. nur wenige H-Brücken vorliegen, wie sie zur Stabilisierung einer α-Helix-Struktur notwendig sind. Craig et al. (176) erhielten dagegen einige Hinweise aus Diffusionsexperimenten auf das Vorhandensein geringer Sekundärstrukturanteile. Edelhoch und Lippolt (117) fanden bei CD-Messungen an ACTH-Analogen keinerlei Sekundärstruktur. Schließlich wurde von Eisinger (178), basierend auf intramolekularen Energietransferbestimmungen durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie (vgl. Kap. IV) ein Modell unterstützt, bei dem zumindest das

N-terminale Ende von ACTH entweder α-Helixstruktur oder eine "ß turn"-artige Faltung besitzt. Die bisher vorliegenden experimentellen Befunde (116, 180) lassen somit keinerlei zuverlässige Aussagen über die Konformation von ACTH zu. Nur zusätzliche experimentelle und theoretische Befunde können hier weiteren Aufschluß bringen: Im anschließenden Kapitel werden CD-Messungen an N-terminalen ACTH-Sequenzen durchgeführt. Hier soll sich zeigen, ob die bisherigen, eher spekulativen Hinweise auf das Vorliegen einer Sekundärstruktur erhärtet werden können. Im Anschluß daran wird erstmals der Versuch unternommen, anhand der in jüngster Zeit entwickelten Vorhersageschemata ein Modell für die Konformation der Gesamtsequenz des ACTH aufzustellen. Zur experimentellen Überprüfung der Zuverlässigkeit solcher Vorhersagen wird die Konformationsanalyse auf einige Analoge des Corticotropin-(1-10)-dekapeptids ausgedehnt. Die Vorhersagen werden abschließend im Lichte der experimentellen Daten kritisch betrachtet.

3.2.2. Ergebnisse

a) $\left[Val^4\right]$ Corticotropin-(1-10)-dekapeptid

Abb. 23 zeigt das CD-Spektrum des $\left[Val^4\right]$ Corticotropin-(1-10)-dekapeptids in vollgeschützter Form (I) und nach Anhydrierung der Seitenkettenschutzgruppen (II) in TFE. Kurve III entspricht dem (2-10)-Nonapeptid mit Seitenkettenschutz. Die charakteristischen CD-Daten deuten bei allen Kurven auf das Vorliegen geringer Anteile α-helikaler Strukturen hin: Neben dem für die "random coil"-Form typischen negativen Cotton-Effekt im Bereich von λ= 205 nm (π-π^* Übergang) ist ein zweites, allerdings schwaches Minimum im Bereich von λ= 220-230 nm beobachtbar (n-π^*- Übergang). Der Helixgehalt läßt sich wegen den Absorptionsbanden von Seitengruppen, die die charakteristische Helixbande bei

λ= 222 nm überdecken, nur qualitativ abschätzen.

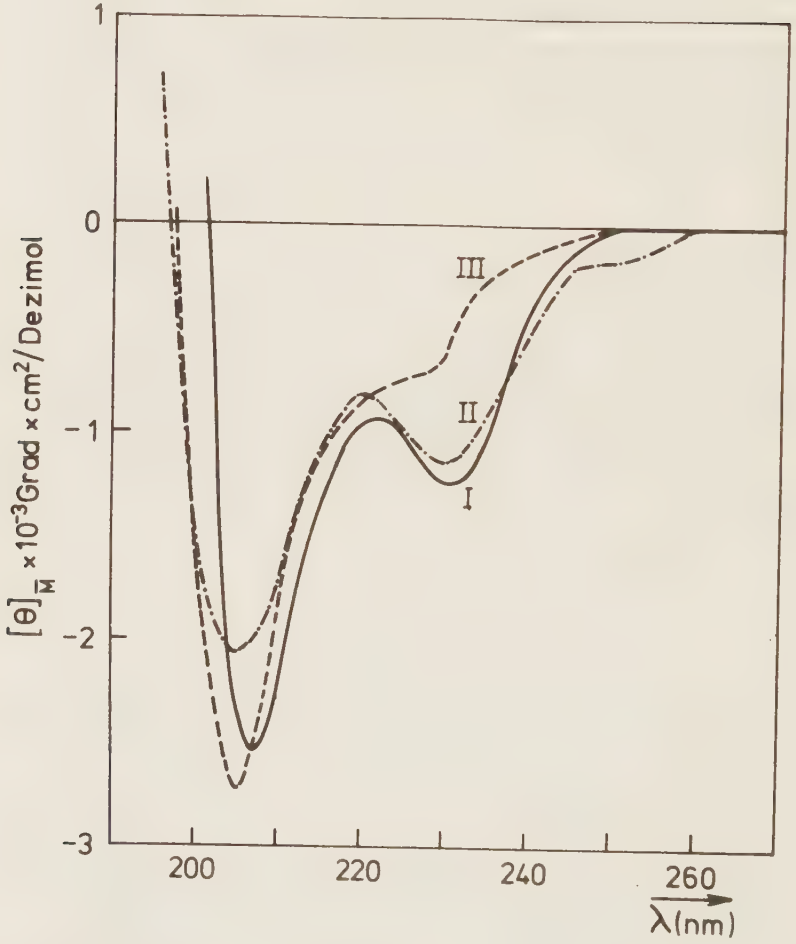


Abb. 23: CD-Kurven von geschütztem (I), ungeschütztem (II) $\left[Val^4\right]$Corticotropin-(1-10)-dekapeptid und von geschütztem (2-10)-Nonapeptid(III) in TFE ($c = 10^{-3}$ M)

Während sich die Anwesenheit der Benzylschutzgruppen kaum auf das CD-Spektrum auswirkt, läßt sich beim Übergang vom Nona- zum Dekapeptid eine deutliche Erhöhung der Elliptizität bei 225 nm feststellen, was eine Zunahme an Sekundärstruktur anzeigt. Aus den Elliptizitätswerten und den Daten der beiden charakteristischen negativen Cottoneffekte sowie des Nulldurchgangs kann auf einen Helixgehalt der Dekapeptide von ca.5-10 % geschlossen werden (87). Das Nonapeptid liegt überwiegend in der "random coil"-Form vor (> 90%).

Beim Übergang vom Helix fördernden Lösungsmittel TFE in Wasser tritt überraschenderweise ein Konformationsübergang auf : Die CD-Spektren in Abb. 24 sind charakteristisch für das Vorliegen einer ß-Struktur (4, 181). Alle drei CD-Kurven zeigen das für eine ß-Struktur typische Minimum bei 218 nm ($n-\pi^*$-Übergang) sowie einen starken positiven Cottoneffekt ($\pi-\pi^*$) bei ca. 198 nm. Während die beiden Dekapeptide (I und II) reine ß-Struktur besitzen, scheinen im Nonapeptid noch geringe Anteile von ungeordneten Strukturen vorhanden zu sein (positiver Cottoneffekt bei 230 nm). Das vollgeschützte Derivat zeigt gegenüber dem ungeschützten Produkt deutlich höhere Elliptizitätswerte. Möglicherweise findet hierbei eine zusätzliche Aggregation der Moleküle zu größeren Verbänden infolge starker hydrophober Wechselwirkungen statt; durch den solubilisierenden Einfluß des PEG bleibt das Peptid jedoch in Lösung. Da die Messungen in TFE bzw. Wasser bei gleicher Konzentration gemacht werden, ist der drastische Wechsel von überwiegend ungeordneter Konformation (TFE) zur ß-Struktur (H_2O) auf einen reinen Lösungsmitteleinfluß zurückzuführen. Ähnliche Lösungsmitteleffekte sind auch bei Homooligopeptiden beobachtet worden (181-183).

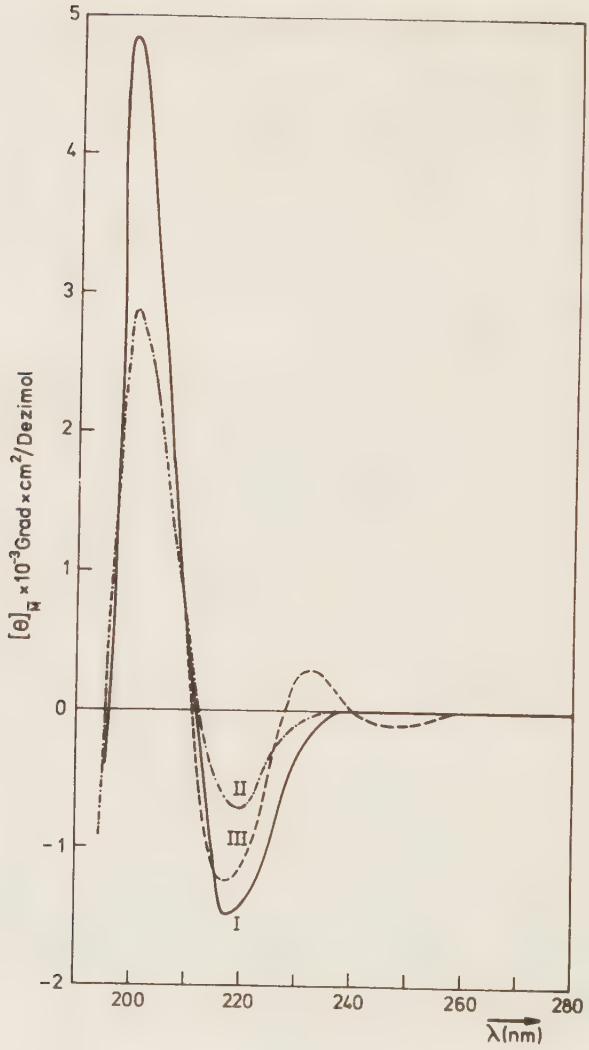


Abb. 24: CD-Kurven von geschütztem (I), ungeschütztem (II) [Val^4] Corticotropin-(1-10)-dekapeptid und von geschütztem (2-9)-Nonapeptid (III) in H_2O ($c = 10^{-3}$M)

b) [Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4] Corticotropin-(1-10)-dekapeptid

Bei den folgenden Konformationsstudien soll untersucht werden, welchen Einfluß die drei N-terminalen Aminosäurereste des ACTH auf die Konformation des Peptids ausüben. Das nach den Vorhersageschemata Helix destabilisierende Kettenende Ser^1-Tyr-Ser wird durch die drei starken Helixbildner Pro^1-Ala-Ala ersetzt, wobei dem N-terminalen Pro eine starke Helix induzierende Wirkung vorhergesagt wird (21-23) (siehe dazu anschließendes Kapitel). Die CD-Spektren vom [Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4] Corticotropin-(1-10)-dekapeptid (I) sowie die der um einen Aminosäurerest (Pro) verkürzten N-BOC-geschützten (II), bzw. ungeschützten Analogen in TFE sind in Abb. 25 dargestellt. Während das N-ungeschützte Nonapeptid (III) praktisch reine "random coil"-Struktur besitzt, deutet die starke Zunahme des negativen Cottoneffekts bei ca. 222 nm (n-π^*-Übergang) auf das Vorliegen beträchtlicher helikaler Anteile im N-BOC-geschützten Peptid (II) hin; die Bedeutung des Aminoendes für die Stabilität der Sekundärstruktur tritt hier besonders deutlich zutage. Wie nach Theorie erwartet, wirkt sich das Anfügen eines Prolinrestes in einer Zunahme an helikaler Struktur aus: Die Elliptizität pro Aminosäurerest $[\theta]_M$ steigt vom Nona- zum Dekapeptid bei λ = 222 nm um ca. 35%. Die charakteristischen CD-Daten lassen auf einen Helixgehalt von ca. 20% im Dekapeptid schließen (87). Während der Helixgehalt der entsprechenden Analogen gegenüber der ACTH-Sequenz (1-10) in TFE somit erwartungsgemäß etwas höher liegt, war nun zu untersuchen, ob der Übergang vom Helix fördernden Lösungsmittel TFE zu Wasser ebenfalls zu einem Konformationswechsel führt. In Abb. 26 sind die CD-Kurven der Analogen I-III in Wasser (pH 7) dargestellt. Der Kurvenverlauf zeigt, daß in diesem Fall kein Konformationsübergang stattfindet. Gegenüber dem organischen Medium tritt in Wasser lediglich eine Destabilisierung der Helixstruktur ein: Das N-ungeschützte Nona-

peptidanaloge (III) besitzt wiederum "random coil"-Struktur (positiver Cottoneffekt bei λ= 220 nm, negativer Cotton-effekt bei λ= 197 nm) und die Derivate I bzw. II haben einen Resthelixgehalt von weit unter 10%.

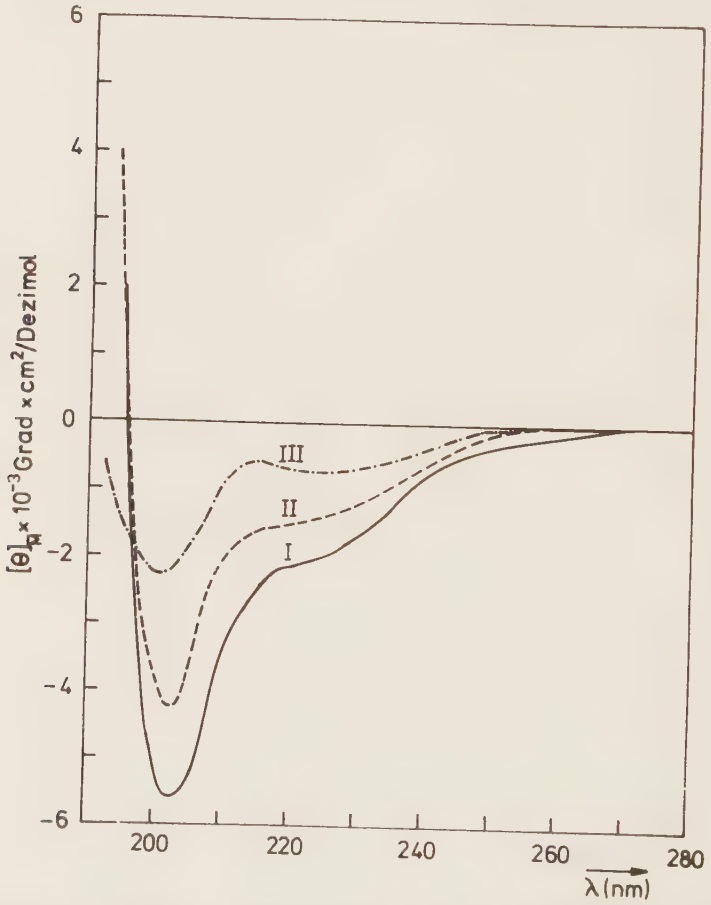


Abb. 25: CD-Spektren von geschütztem $\left[Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4\right]$ Corticotropin-(1-10)-dekapeptid (I) und von N-geschütztem (II) bzw. ungeschütztem (2-10)-Nonapeptid (III) in TFE ($c = 10^{-3}$M)

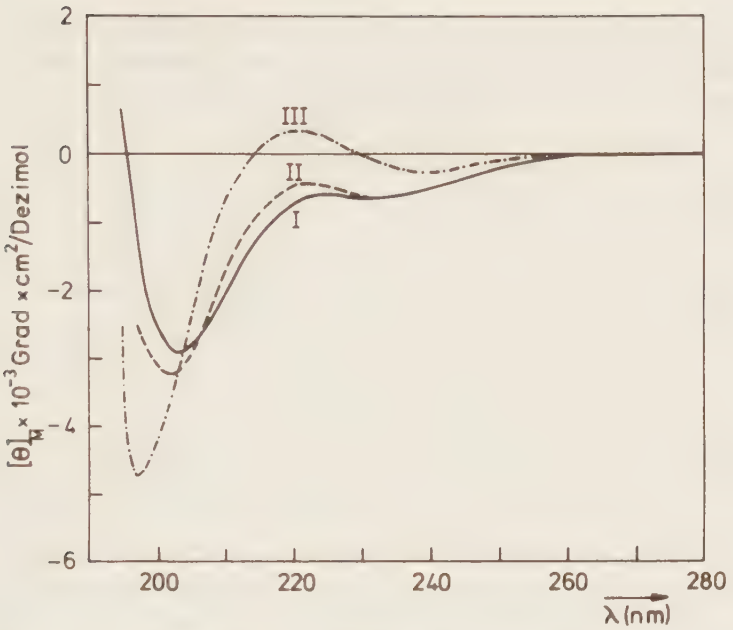


Abb. 26: CD-Spektren von geschütztem [Pro^1,Ala^2,Ala^3,Val^4] Corticotropin-(1-10)-dekapeptid (I) und von N-geschütztem (II) bzw. ungeschütztem (2-10)-Nonapeptid (III) in H_2O (c = 10^{-3} M)

Die Abnahme der Elliptizitätswerte beim Übergang vom organischen Milieu in Wasser ist dabei ein oft zu beobachtendes Phänomen. Der drastische Einfluß des Aminoendes auf die Konformation zeigt sich auch im wässrigen Medium: Wiederum unterscheiden sich die CD-Spektren der N-BOC-geschützten bzw. ungeschützten Derivate erheblich.

c) Corticotropin-(11-23)-tridekapeptid

Die ACTH-Sequenz 11-23 enthält sechs basische Aminosäuren und verfügt deshalb in ungeschützter Form über mehrere positive Ladungen; die Konformation des ungeschützten Peptids

sollte sich demnach erheblich von der seitenkettengeschützten Form des Peptids unterscheiden. Die entsprechenden CD-Spektren sind in Abb. 27 dargestellt.

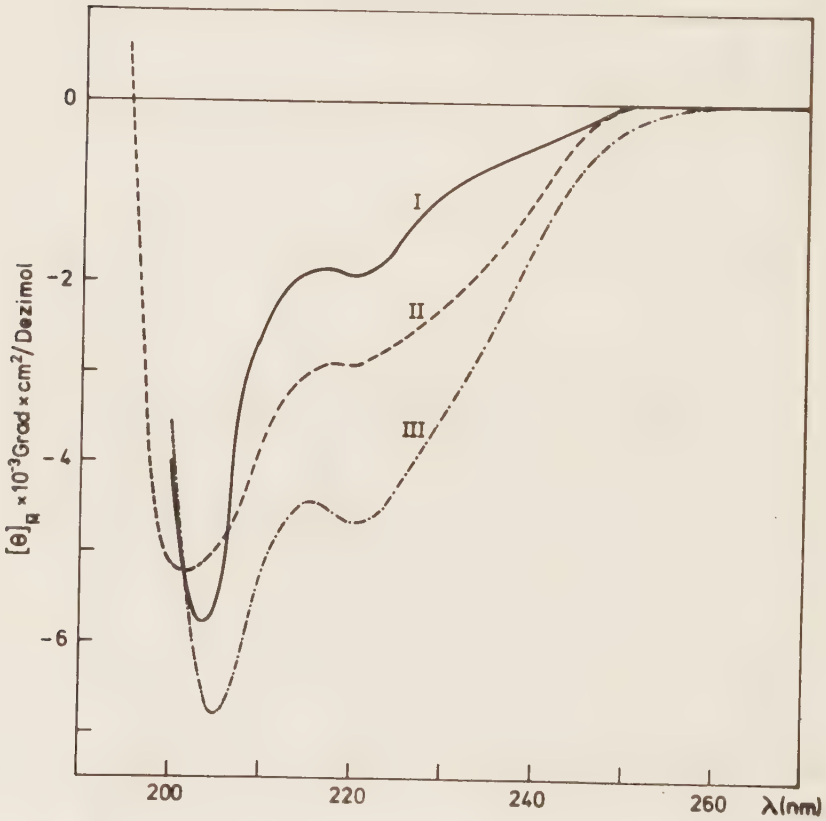


Abb. 27: CD-Kurven von ungeschütztem (I in H_2O; II in TFE) und geschütztem (III in TFE) Corticotropin-(11-23)-tridekapeptid ($c = 10^{-3}$ M)

Erwartungsgemäß besitzt das ungeschützte Tridekapeptid in Wasser (Kurve I) praktisch keine Sekundärstruktur. Der aus den Elliptizitätswerten ermittelte Anteil an α-Helixstruktur liegt unter 10%. Beim Übergang in das Helix fördernde Lösungsmittel TFE (Kurve II) nimmt der helikale Anteil gegenüber der ungeordneten Form zwar signifikant zu (Vertiefung des Minimums bei 222 nm), liegt aber nicht über 20%. Eine deutliche Zunahme an Sekundärstruktur ist dagegen bei dem geschützten Tridekapeptid in TFE (Kurve III) feststellbar: Der negative Cottoneffekt des n- π*-Übergangs bei 222 nm, der ein Maß für den Gehalt an α-Helixstruktur darstellt, erfährt gegenüber dem ungeschützten Peptid eine Elliptizitätszunahme von 40%. Gleichzeitig verschiebt sich der kurzwellige negative Cottoneffekt (π - π*-Übergang) geringfügig in den längerwelligen Bereich. Aus den charakteristischen CD-Daten ergibt sich ein Helixanteil von ca. 30% (87). (Bezüglich der Interpretation dieser Ergebnisse siehe abschließende Diskussion in Kap. III). Wie bei den vorherigen Beispielen beobachtet, nehmen die Elliptizitäten beim Übergang vom organischen Medium zu Wasser auch hier erheblich ab.

4. Vorhersagen der Konformation durch Konformationsberechnungen

4.1. Allgemeines zu Konformationsberechnungen

Das Ziel der Konformationsenergieberechnungen ist die theoretische Vorhersage der dreidimensionalen Struktur eines Proteins aufgrund der gegebenen Primärstruktur. Damit sind auch rein praktische Ziele verbunden: Die Aufklärung des Struktur-Funktionszusammenhangs, die Erfassung energetisch ungünstiger, metastabiler Konformationszustände, wie sie bei Enzym-Substratwechselwirkungen eine Rolle spielen, oder die gezielte Synthese von interessanten Peptidanalogen sind einige Beispiele.

Allen theoretischen Ansätzen liegt die Arbeitshypothese zugrunde, daß die Konformationsenergie der nativen Konformation einem lokalen Minimum in der Energiehyperfläche entspricht, das nicht zwangsläufig das energetisch tiefste Minimum sein muß (Abb. 28) (138, 184). Diese - heute allgemein akzeptierte - Hypothese basiert auf experimentellen Untersuchungen von Anfinsen an Ribonuklease (1).

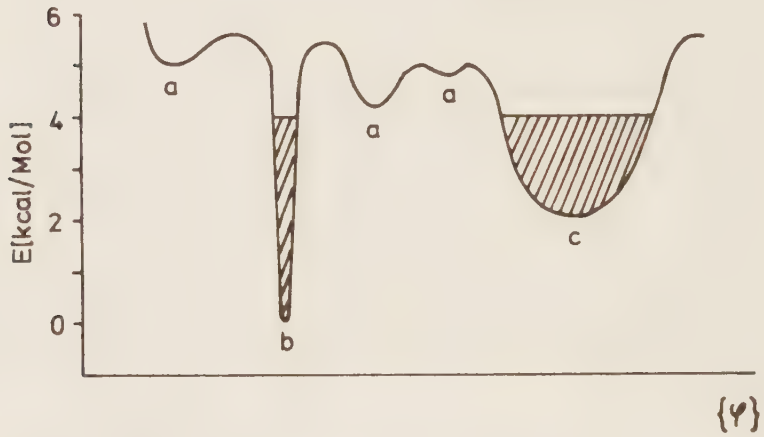


Abb. 28: Profil der Energiehyperfläche mit lokalen Minima (a), absolutem (b) und globalem (c) Minimum

Die Berechnung stabiler Konformationen eines Peptids oder Proteins umfaßt somit 3 Schritte:

1. Die Geometrie der Polypeptidkette muß bekannt sein, und die Konformationsenergie muß durch geeignete Potentialfunktionen als Funktion der Koordinaten des Makromoleküls berechenbar sein.

2. Die Konformationsenergie muß minimalisiert werden, um die verschiedenen lokalen Minima eines Proteins zu erfassen. Hierbei werden alle Wechselwirkungen im Molekül berücksichtigt.
3. Das statistische Gewicht muß unter Einschluß der Konformationsentropie für jedes Minimum ermittelt werden.

Der erste Schritt kann weitgehend als gelöst betrachtet werden: Es ist möglich, die Konformation eines Proteins aufgrund der gegebenen Strukturdaten (Bindungswinkel und Bindungslängen) in Form kartesischer Koordinaten zu beschreiben. Die Konformationsenergie kann dann für die spezifische Konformation z.B. mit Hilfe semiempirischer Potentialfunktionen (siehe Kap. IV) berechnet werden.

Der zweite Schritt ist bis heute nicht befriedigend gelöst. Zwar gibt es genügend mathematische Verfahren, mit denen eine Funktion (z.B. $E\{\varphi,\psi\}$) mit mehreren Variablen (z.B. die Diederwinkel φ und ψ, Bindungwinkel und Bindungslängen werden konstant gehalten) minimalisiert werden kann; Das Problem besteht vielmehr darin, daß es in der multidimensionalen Energiehyperfläche sehr viele lokale Minima gibt, sodaß der Rechenaufwand selbst bei relativ kurzen Peptiden unverhältnismäßig groß wird ("Multiminimaproblem") (184).

Schritt 3, der Schritt 2 voraussetzt, ist wiederum unproblematisch. Inzwischen sind viele Versuche unternommen worden, das Multiminimaproblem zu umgehen; der vielversprechendste Ansatz scheint darin zu bestehen, gewisse sterisch begünstigte Startkonformationen anhand der Primärsequenz empirisch zu ermitteln. Beginnt man nun mit der Energieminimalisierung bei einer bereits in der Nähe der nativen Konformation befindlichen Konformation des Proteins (z.B. im "richtigen" Energietal, siehe Abb. 28), so wird der Rechenaufwand erheblich verringert, da nicht sämtliche lokale Energieminima gefunden und minimalisiert werden müssen.

Wie läßt sich nun die erforderliche Vorinformation ohne großen Rechenaufwand erhalten?

Die Fülle der heute vorliegenden experimentellen Befunde lassen den Schluß zu, daß für die Ausbildung einer bestimmten Konformation die kurzreichenden Wechselwirkungen innerhalb einer Peptidkette dominierend sind (12). Dies bedeutet, daß die Tendenz eines einzelnen Aminosäurebausteins, bestimmte Konformationen bevorzugt einzunehmen, unabhängig von seiner Nachbarschaft (z.B. der Umgebung im Peptidverband) bestehen bleibt; diese Bevorzugung charakteristischer φ/ψ-Diederwinkelpaare ergibt sich aus der Wechselwirkung zwischen der Aminosäureseitengruppe und ihrem eigenen Grundgerüst und läßt sich als sog. Konformationsenergiediagramm - erstmals von Ramachandran vorgeschlagen (186) - graphisch darstellen (Abb. 29).
Aus dem Diagramm für L-Alanin, bei dem die sterisch erlaubten φ/ψ-Paare als umrandete Zonen (Abb. 29 a) gekennzeichnet sind, geht hervor, daß nur ca. 30% der gesamten Konformationsenergieoberfläche dem Molekül zugänglich sind. Aus der Berechnung der Konformationsenergie (vgl. Kap. IV.2.) ergibt sich nun, daß die erlaubten Zonen unterschiedliche Konformationsenergien besitzen, sodaß jeder Region (z.B. α-Helix, ß-Struktur oder übrige) ein verschiedenes, für jede Aminosäure charakteristisches statistisches Gewicht zukommt (Abb. 29 b). Die Berücksichtigung dieser Vorzugskonformationen für jeden in der Sequenz vorkommenden Aminosäurerest kann nun bereits als Startkonformation für eine Energieminimalisierung dienen. Daraus ist sofort ersichtlich, daß die Anzahl möglicher Konformationen eines Proteins drastisch verringert wird (187, 120).

Alternativ werden die Wahrscheinlichkeiten für eine bestimmte Vorzugskonformation einer Aminosäure aus experimentellen Daten, vornehmlich aus röntgenographischen Untersuchungen, ermittelt (siehe unten).

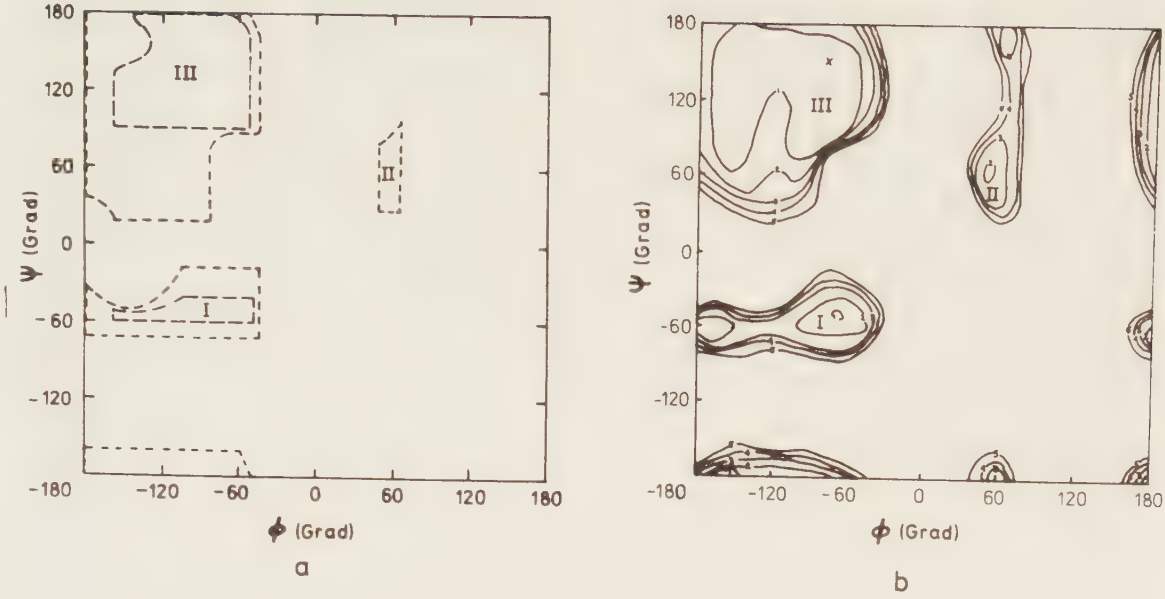


Abb. 29: Ø /Ψ -Diagramme für L-Alanin; a: Ramachandran Plot (hard sphere model), b: Konformationsenergiediagramm (201)

Die Praxis hat gezeigt, daß diese Maßnahme - die Berücksichtigung aller bevorzugten Konformationen für die einzelnen Aminosäuren einer Sequenz - noch nicht ausreicht, um den Rechenaufwand zur Ermittlung der Konformation mit dem größten statistischen Gewicht in akzeptablen Schranken zu halten. Dieser Umstand hat zur Entwicklung weiterer empirischer Regeln geführt, die als sog. Vorhersageschemata ("prediction codes") bekannt geworden sind und auf die im Folgenden ausführlicher eingegangen wird. Hierbei handelt es sich um den Versuch, kooperative Effekte innerhalb einer Peptidkette zu berücksichtigen: Die Gesamtsequenz eines Proteins oder Peptids wird dabei in Bereiche mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Bildung von geordneten (α-Helix, ß-Struktur) und ungeordneten Strukturen eingeteilt. Auf diese Weise ist es möglich, die Anzahl möglicher Startkonformationen erheblich zu reduzieren. Die Einführung dieser "prediction codes" hat neben der Festlegung energetisch günstiger Startkonformationen für eine Energieminimalisierung noch weitere, für die Praxis äußerst hilfreiche Anwendungsmöglichkeiten gefunden (189):

- Die Auswertung von Röntgenstrukturanalysen kann durch die Vorhersage von Bereichen mit Sekundärstruktur wesentlich erleichtert werden.
- Segmente eines Proteins, die bei geringer Änderung des Mediums ihre Konformation ändern, können erkannt werden.
- Die Synthese von Peptidanalogen kann gezielter erfolgen, ebenso können die Konsequenzen beim Ersatz einzelner Aminosäuren - z.B. als Test für die Spezifität der biologischen Aktivität - vorhergesagt werden.

Trotz des empirischen Charakters dieser Vorhersageschemata gelingt es, ca. 80% der in Proteinen vorkommenden Aminosäuren in der richtigen Konformation vorherzusagen (18, 19, 23). In Kap. III.4.3. wird mit Hilfe dieser Verfahren ein Modell für die Konformation des ACTH erstellt. Dabei kommt eine

in jüngster Zeit von Scheraga et al. entwickelte statistisch-mechanische Behandlung erstmals zur Anwendung (21-24). Die Grundlagen dieses mathematisch eleganten Verfahrens werden anschließend dargelegt.

4.2. Grundlagen der Vorhersageschemata

4.2.1. Chou-Fasman-Methode (18, 19)

Die Konformationsparameter, die ein Maß für die relative Wahrscheinlichkeit der drei festgelegten Konformationsklassen - α-Helix, ß-Struktur und ungeordnete Konformationen* - darstellen, werden aus den Röntgenstrukturen von 15 Proteinen für alle 20 natürlich vorkommenden Aminosäurereste wie folgt bestimmt: Die Häufigkeit $f_{i,k}$ ihres Vorkommens in diesen 3 Konformationsklassen (k) wird erhalten durch:

$$f_{i,k} = \frac{n_{i,k}}{n_i} \qquad (1)$$

wobei $n_{i,k}$ gleich der Anzahl der Aminosäure i in Konformationsklasse k ist und n_i der Gesamtzahl der Aminosäuren in allen 15 Proteinen entspricht. $f_{i,k}$ ist somit ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, den Aminosäurerest i in der Konformation k vorzufinden. Somit wird die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit (oder Häufigkeit) für den Konformationszustand k aller 20 Aminosäurereste:

$$\langle f_k \rangle = \sum f_{i,k} \Big/ \sum i \quad \text{wobei} \sum i = 20 \qquad (2)$$

---

* Zu den helikalen Strukturen werden hier auch Bereiche gezählt, die in einer α_I-, α_{II}-, 3_{10}- bzw. in einer verdrehten Helix vorliegen.
In der Klasse "ungeordnete" Konformation werden alle φ/ψ - Diederwinkelpaare zusammengefaßt, die nicht in die Bereiche α-Helix (Zone I und II in Abb. 29) oder ß-Struktur (Zone III in Abb. 29) fallen.

Wird nun $f_{i,k}$ durch $\langle f_k \rangle$ normalisiert, dann erhält man den Konformationsparameter $P_{i,k}$ für Aminosäure i * :

$$P_{i,k} = f_{i,k} \Big/ \langle f_k \rangle \qquad (3)$$

Der Prozentsatz an Aminosäureresten in helikaler, ß- und ungeordneter Struktur beträgt bei den 15 untersuchten Proteinen 36, 17 und 47%, respektive. Der Konformationsparameter P_α kann mit dem aus der Zimm-Bragg'schen Gleichung experimentell ermittelten Helixwachstumsparameter s (144) in Beziehung gesetzt werden. Ein Vergleich dieser Werte für 7 Aminosäuren ergibt überraschend gute Übereinstimmung. Somit kann P_α als Parameter für die Tendenz eines Aminosäurerestes, in der helikalen Konformation vorzuliegen, aufgefaßt werden. Entsprechend Chou und Fasman werden nun alle Aminosäurereste einer Sequenz als Bildner oder Brecher von Helix- und ß-Strukturen bzw. als indifferent bezüglich Helix- und ß-Strukturbildung eingestuft. In Tabelle 5 sind die Helix-, ß-Struktur- und "ß turn"-Potentiale** P_α, P_β und P_t der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren mit folgender Klassifizierung angeordnet:

H_α = starker Helixbildner
h_α = Helixbildner
I_α = schwacher Helixbildner
i_α = indifferent bez. Helixbildung
b_α = Helixbrecher
B_α = starker Helixbrecher

---

* Die Indizes i werden im folgenden der Übersichtlichkeit wegen weggelassen.

** Als "ß turn" wird eine Konformation bezeichnet, bei der die C^α-Atome der Aminosäurereste i und i+3 einen Abstand von $r \leq 7$ Å besitzen (siehe Abb. 19).

As	P_α		As	P_β		As	P_t
Glu (-)	1.53		Met	1.67		Gly	1.68
Ala	1.45	H_α	Val	1.65	H_β	Asn	1.68
Leu	1.34		Ile	1.60		Ser	1.56
His (+)	1.24		Cys	1.30		Pro	1.54
Met	1.20		Tyr	1.29		Asp (-)	1.26
Gln	1.17		Phe	1.28		Tyr	1.25
Trp	1.14	h_α	Gln	1.23	h_β	Cys	1.17
Val	1.14		Leu	1.22		Trp	1.11
Phe	1.12		Thr	1.20		Lys (+)	1.01
Lys (+)	1.07		Trp	1.19		Arg (+)	1.00
Ile	1.00	I_α	Ala	0.97	I_β	Thr	1.00
Asp (-)	0.98		Arg (+)	0.90		Phe	0.71
Thr	0.82		Gly	0.81	i_β	His (+)	0.69
Ser	0.79	i_α	Asp (-)	0.80		Met	0.67
Arg (+)	0.79		Lys (+)	0.74		Ile	0.58
Cys	0.77		Ser	0.72		Ala	0.57
Asn	0.73	b_α	His (+)	0.71	b_β	Gln	0.56
Tyr	0.61		Asn	0.65		Leu	0.53
Pro	0.59	B_α	Pro	0.62		Glu (-)	0.44
Gly	0.53		Glu (-)	0.26	B_β	Val	0.30

Tab. 5: P_α-, P_β- und P_t-Werte der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (18)

Eine entsprechende Einteilung gilt für die ß-Struktur (Indizes ß). Die Analyse von Aminosäureresten in Helix-Coil-grenzregionen und in innerhelikalen Bereichen ergab, daß Aminosäurereste mit dem höchsten Helixpotential ($P_\alpha \gg 1$) vorwiegend im Zentrum einer Helix vorkommen, während starke Helixbrecher ($P_\alpha \ll 1$) vor allem in den Übergangsregionen zu finden sind. Dieser Sachverhalt läßt vermuten, daß die Helixinitiierung im Zentrum eines Helixbereichs beginnt und in beide Richtungen fortschreitet bis starke Helixbrecher das Helixwachstum beenden.

In einem weiteren Schritt können Aussagen über das Auftreten von "ß turns" gemacht werden. Für jede Aminosäure kann anhand von Röntgenstrukturdaten die Häufigkeit ihres Vorkommens in einem "ß turn" in erster, zweiter, dritter, bzw. vierter Position entsprechend f_i, f_{i+1}, f_{i+2} und f_{i+3} berechnet werden:

$$f_i = \frac{i}{n} \quad , \quad f_{i+1} = \frac{(i+1)}{n} \qquad \text{etc.}$$

wobei n dem Vorkommen einer bestimmten Aminosäure in den untersuchten Proteinen allgemein, und i, (i+1), (i+2), (i+3) dem Vorkommen in der ersten, zweiten, dritten bzw. vierten Position des "ß turns" entsprechen. Als weitere Größe charakterisiert das "ß turn"-Potential P_t die Tendenz einer Aminosäure in einem "ß turn" aufzutreten (siehe Tab. 5). P_t wird analog dem α-, bzw. ß-Potential berechnet:

$$P_t = f_t \Big/ \langle f_t \rangle \qquad f_t = n_t/n \qquad \langle f_t \rangle = \sum f_t \Big/ \sum i$$

wobei n_t und n dem Vorkommen eines Aminosäurerestes in "ß turns" bzw. in allen Regionen der untersuchten Proteine entsprechen, und $\langle f_t \rangle$ die durchschnittliche Häufigkeit ist, mit der die untersuchten Aminosäuren (i = 20) in "ß turns" gefunden werden.

Zur Vorhersage von Sekundärstrukturen geht man wie im Folgenden beschrieben vor.

A. Bestimmung der helikalen Regionen

1. Helixinitiierung: Man lokalisiert Gruppen von 4 helikalen Resten (h_α oder H_α) von insgesamt 6 Aminosäureresten entlang der Peptidkette, schwache Bildner (I_α) zählen als 0.5 h_α. Helixbildung ist ungünstig, wenn das Segment 1/3 oder mehr Helixbrecher (b_α, B_α) oder weniger als die Hälfte Helixbildner enthält.

2. Helixabbruch: Man verlängert das helikale Segment in beide Richtungen, bis es durch Tetrapeptide mit $\langle P_\alpha \rangle < 1.00$ beendet wird. Angrenzende ß-Bereiche können ebenso zur Beendigung der α-Region führen.

3. Prolin kann nicht im Innern der Helix oder am C-Terminus einer α-Helix vorkommen.

4. Helixgrenzen: Pro, $Asp^{(-)}$, $Glu^{(-)}$ bevorzugen den N-Terminus, $His^{(+)}$, $Lys^{(+)}$, $Arg^{(+)}$ bevorzugen den C-Terminus der Helix. Wenn Pro und Asp in der Nähe des N-Terminus der Helixregion vorkommen, werden sie als schwache Helixbildner (I_α) eingestuft; das gleiche gilt für Arg in der Nähe des C-Terminus.

1. Regel: Für jedes Segment von 6 oder mehr Aminosäureresten mit $\langle P_\alpha \rangle \geq 1.03$ und $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$, das zusätzlich die Bedingungen A1 bis A4 erfüllt, wird eine α-Helix vorhergesagt.

B. Bestimmung der ß-Faltblattregionen

1. Faltblattinitiierung: Man lokalisiert Gruppen von 3 ß-Resten (h_β oder H_β) von insgesamt 5 Aminosäureresten entlang der Peptidkette. Die Ausbildung von ß-Strukturen ist ungünstig, wenn die Sequenz 1/3 oder mehr ß-Strukturbrecher (b_β, B_β) oder weniger als die Hälfte ß-Strukturbildner enthält.

2. Faltblattende: es gilt Bedingung A2, die für das Helixende aufgestellt wurde mit dem Unterschied, daß α durch ß und vice versa ersetzt wird.

3. $Glu^{(-)}$ kommt selten in ß-Faltblattregionen vor. Pro kommt selten im Innern von ß-Faltblattregionen vor.

4. Grenzen von ß-Strukturbereichen: Geladene Aminosäurereste kommen selten am N-Terminus und nicht sehr häufig im Innern und am C-Terminus von Faltblattregionen vor.

2. Regel: Für jedes Segment von 5 oder mehr Aminosäuren mit $\langle P_\beta \rangle \geq 1.05$ und $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$, das zusätzlich die Bedingungen B1 bis B4 erfüllt, wird eine ß-Struktur vorhergesagt.

C. Bestimmung von "ß turns"

Für jedes Tetrapeptid in der Sequenz wird die relative Wahrscheinlichkeit p_t, daß es in einem "ß turn" vorliegt, nach

$$p_t = f_i \cdot f_{i+1} \cdot f_{i+2} \cdot f_{i+3}$$

berechnet. f_i, f_{i+1} etc. entsprechen den oben definierten Häufigkeiten.

3. Regel: Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Tetrapeptid in einer Sequenz als "ß turn" vorliegt, ist groß, wenn $\langle P_\alpha \rangle < 0.90$, $\langle P_t \rangle > \langle P_\beta \rangle$ und $p_t > 0.5.10^{-4}$ ist.

Mit diesen drei grundlegenden Regeln kann die Vorhersage von Sekundärstrukturbereichen in Proteinen erfolgen. Sie werden am Beispiel des ACTH (Kap. III.4.3.2.) auf ein spezifisches Peptid angewandt.

4.2.2. Tanaka-Scheraga-Methode (21-24)

Die von Tanaka und Scheraga in jüngster Zeit entwickelte statistisch-mechanische Behandlung der Proteinkonformation beruht zwar - ähnlich wie die Chou-Fasman-Methode - auf aus röntgenographischen Daten ermittelten statistischen Gewichten für die einzelnen bevorzugten Konformationen einer Aminosäure, unterscheidet sich aber in der mathematischen Behandlung, die zur Vorhersage von Sekundärstrukturbereichen führen, wesentlich von allen bisherigen Vorhersagemethoden:

- Die statistisch-mechanische Behandlung läßt jede beliebige Anzahl von Konformationszuständen ("Multistate Modell" (24)) zu.
- Kooperative Effekte (z.B. Nachbarschaftsabhängigkeit des statistischen Gewichts eines Aminosäurerestes) werden bei der Berechnung der Konformationsparameter miteinbezogen.
- Die mathematische Behandlung läßt die Einbeziehung weiterer Vorhersageregeln ohne zusätzlichen Rechenaufwand zu.

Obwohl der Aufwand beträchtlich ist (im Gegensatz zu anderen Methoden (18, 51, 55, 121, 162) muß ein Computerprogramm aufgestellt werden), ist die effektive Rechenzeit - nachdem der mathematische Formalismus bewältigt ist - im Vergleich zu Konformationsenergieberechnungen an Proteinen äußerst gering. Aus diesem Grunde sollte dieser Behandlung zur Vorhersage von Proteinkonformationen große Bedeutung zukommen.

Nach dem in dieser Arbeit angewandten "Drei-Zustands-Modell" werden zunächst wie oben beschrieben die statistischen Gewichte für die Zustände α-Helix, ausgestreckte Konformation* und ungeordnete Struktur** aus Röntgenstrukturanalysen von 25 Proteinen ermittelt***.

Nach dem "Nachbarschaftsmodell", das von Flory zur Berechnung der Kettendimensionen von Polymeren auf der Basis des Ising-Modells entwickelt wurde (10), wird die gegenseitige Abhängigkeit zweier Peptideinheiten berücksichtigt. Danach ergibt sich für das "Drei-Zustands-Modell" folgende statistische Gewichtsmatrize für Aminosäurerest i:

---

* Tanaka und Scheraga benutzen den Begriff "ausgestreckte Konformation" (extended conformation = E) anstelle des Begriffs ß-Konformation, obwohl der gleiche φ/ψ -Bereich im Konformationsdiagramm umfaßt wird.

** Um mit Tanaka und Scheraga konsistent zu sein, wird zur Bezeichnung dieser Konformationsklasse der Begriff "coil-Konformation" (=C) benützt.

*** Bez. geringer Abweichungen in der Ermittlung der Konformationsparameter gegenüber Chou und Fasman siehe Ref.60 in (21).

$$W_i = \begin{array}{c} \begin{matrix} i \rightarrow & c & \beta & \alpha & i-1 \\ & & & & \downarrow \end{matrix} \\ \begin{bmatrix} 1 & V_\varepsilon^* & (V_h^*)^2/W_h^* & c \\ 1 & V_\varepsilon^* & (V_h^*)^2/W_h^* & \beta \\ 1 & V_\varepsilon^* & W_h^* & \alpha \end{bmatrix}_i \end{array}$$

wobei V_ε^* = statistisches Gewicht für ε-Konformation

V_h^* = statistisches Gewicht für α-helikalen Aminosäurerest am Ende einer α-Helix

W_h^* = statistisches Gewicht für einen Aminosäurerest im Innern einer α-Helix.

(*) bedeutet, daß die statistischen Gewichte so normalisiert sind, daß der "coil-Zustand" den Wert 1 erhält. Die Anordnung der statistischen Gewichte bedeutet, daß z.B. das 2,3-Glied $\left[(V_h^*)^2 / W_h^*\right]$ dem statistischen Gewicht für die Aminosäure i im α-helikalen Zustand entspricht, wenn der Vorgänger in der Sequenz, also Aminosäure i-1, in der β-Konformation vorliegt.

Die Zustandssumme ergibt sich dann als dem Produkt der statistischen Gewichtsmatrizen zu:

$$Z = e_1 \left[\prod_{i=1}^{N} W_i \right] e_N^* \qquad (5)$$

wobei $e_1 = (1\ 0\ 0)$ und $e_N^* = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix}$

Nach den Regeln der Matrizenmultiplikation (193) lassen sich nun statistisch-mechanische Durchschnittsgrößen berechnen. Die hier interessierende Größe ist die Wahrscheinlichkeit, daß eine bestimmte Sequenz in einer definierten Konformation vorliegt ("conformational sequence probability").

Relative statistische Gewichte

Amino-säure j	$W_{h,j}^*$	$V_{\varepsilon,j}^*$	$V_{h,j}^*$
Ala	1.549	0.500	0.030
Arg	0.468	0.298	0.026
Asn	0.304	0.152	0.023
Asp	0.481	0.130	0.023
Cys	0.444	0.556	0.031
Gln	0.795	0.432	0.029
Glu	1.188	0.250	0.025
Gly	0.226	0.195	0.024
His	0.535	0.233	0.025
Ile	0.891	0.587	0.032
Leu	1.343	0.702	0.034
Lys	0.726	0.253	0.025
Met	1.000	0.667	0.033
Phe	0.727	0.318	0.026
Pro	0.315	0.333	0.027
Ser	0.336	0.234	0.025
Thr	0.488	0.464	0.029
Trp	1.105	0.421	0.028
Tyr	0.262	0.410	0.028
Val	1.028	0.789	0.036

Tab. 6: Relative statistische Gewichte $W_{h,j}^*$, $V_{h,j}^*$ und $V_{\varepsilon,j}^*$ der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren j
(siehe Seite 96)

P (i/n/ $\{\varphi\}$) entspricht der Wahrscheinlichkeit, daß eine Sequenz von n Aminosäureresten, beginnend mit dem Aminosäurerest i, in der Konformation $\{\varphi\}$ vorliegt, wobei $\{\varphi\}$ die Aufeinanderfolge bestimmter Diederwinkel , z.B. $\{\alpha_i, \alpha_{i+1}, \varepsilon_{i+2} \cdots \alpha_{i+n-1}\}$ bedeutet.

Zur Berechnung von P ist es zweckmäßig "A priori" - und "konditionelle" Wahrscheinlichkeiten einzuführen, die sich aus den Wahrscheinlichkeiten erster (Gl. 6) bzw. zweiter Ordnung (Gl. 7) ergeben:

$$F_{i;\eta_i} = z^{-1} e_1 \left[\prod_{\gamma=1}^{i-1} W_\gamma \right] \left[W_i^* \right] \left[\prod_{e=i+1}^{N} W_e \right] e_N^* \qquad (6)$$

bzw.

$$F_{i;\eta_{i-1}\eta_i} = z^{-1} e_1 \left[\prod_{\gamma=1}^{i-2} W_\gamma \right] \left[\prod_{k=i-1}^{i} W_k^* \right] \left[\prod_{e=i+1}^{N} W_e \right] e_N^* \qquad (7)$$

wobei W_i^* bzw. W_k^* durch Streichung aller Matrizenelemente u (Null setzen) außer der Kolonne mit der Konformation η zustande kommt.

Die "konditionelle" Wahrscheinlichkeit ergibt sich dann zu:

$$P_{i;\eta_{i-1}\eta_i} = \frac{F_{i;\eta_{i-1}\eta_i}}{F_{i-1;\eta_{i-1}}} \qquad (8)$$

Aus diesen Beziehungen läßt sich nun P berechnen als:

$$P_{(i|n|\{\beta\})} = F_{i;\eta_i} \left[\prod_{k=i}^{i+n-2} P_{k+1;\eta_k\eta_{k+1}} \right]_{\{\beta\}} \qquad (9)$$

wobei $F_{i,\eta_i} = P\ (i/1/\eta_i)$ der "A-priori-Wahrscheinlichkeit" 1. Ordnung für den Aminosäurerest i entspricht, in der Konformation η_i vorzuliegen. $P_{k+1;\eta_k\eta_{k+1}}$ entspricht der "konditionellen" Wahrscheinlichkeit, daß Aminosäurerest i+1 die Konformation η_{i+1} besitzt, wenn gleichzeitig Aminosäurerest i die Konformation η_i besitzt. Gleichung (9), die bei den im folgenden Kapitel beschriebenen Berechnungen ausschließlich verwendet wird, besitzt den Vorteil, daß zur Berechnung von $P\ (i/n/\{\varsigma\})$ mit beliebigem Startpunkt i und Kettenlänge n lediglich die am Anfang für alle Aminosäuren bzw. Aminosäurepaare berechneten Größen F_i und P_{k+1} miteinander multipliziert werden müssen.

In der anschließend durchgeführten Behandlung von ACTH-Sequenzen werden folgende Wahrscheinlichkeiten berechnet:

$P(i/3/\{\alpha\})$, $P(i/3/\{c\})$, $P(i/4/\{\varepsilon\})$ und $P(i/4/\{c\})$.

Damit werden sämtliche Segmente innerhalb der Sequenz erfaßt, die über 3 Aminosäurereste (Mindestlänge für α-Helixbildung) in der helikalen, bzw. Coil-Konformation, und über 4 Aminosäurereste in der ausgestreckten bzw. Coil-Konformation vorliegen. Die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit für diese Segmente ist dann:

$$\Theta_{\{\varsigma\}} = \frac{1}{N-2} \sum_{i=1}^{N-2} P_{(i|n|\{\varsigma\})} \qquad (10)$$

und die relative Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Konformation definierter Kettenlänge P* erhält man als

$$P^*_{(i|n|\{\varsigma\})} = P_{(i|n|\{\varsigma\})} / \Theta_{\{\varsigma\}} \qquad (11)$$

Liegt der Wert von P* für eine bestimmte Sequenz und Konformation über 1, wird das Vorliegen dieser Konformation mit hoher Wahrscheinlichkeit vorausgesagt. Für die Vorhersage von Sekundärstrukturbereichen bilden somit die Werte von P* die Basis. Die weiteren Vorhersageregeln werden im folgenden Kapitel an speziellen Beispielen erläutert. Das dargelegte Vorgehen wird dabei erstmals auf die Sequenz von ACTH angewandt.

4.3. Ergebnisse der Vorhersagen

4.3.1. Oligopeptide

Die relativen Stabilitäten für die spezifischen Strukturen der verschiedenen Oligomere ergeben sich direkt aus den Konformationsparametern der jeweiligen Aminosäuren. Legt man die Daten von Chou und Fasman zugrunde (18, 19), ergeben sich folgende Werte für P_α bzw. P_β:

	P_α	P_β
Ala	1.45	0.97
Val	1.14	1.65
Ile	1.00	1.60

Während nach diesen aus Röntgenstrukturdaten ermittelten statistischen Gewichten für Oligo- [L-Ala] die α-Helixstruktur stabiler sein sollte, besitzt die ß-Struktur für die Oligomere von L-Val und L-Ile das wesentlich größere statistische Gewicht. Aus dem relativen Unterschied der Daten für P_α und P_β ergibt sich folgende Vorhersage für die Stabilität der ß-Strukturen*: Ala < Val < Ile. Diese Stabilitätsskala konnte experimentell bestätigt werden.

* Die statistisch-mechanische Behandlung nach Tanaka und Scheraga führt zum qualitativ gleichen Ergebnis.

4.3.2. ACTH-Sequenzen

a) Chou-Fasman-Code:

Tabelle 7 enthält die Aminosäuren der ACTH-Sequenz, ihre P_α- und P_β-Parameter sowie die Klassifizierung in Bildner oder Brecher von α-Helix bzw. ß-Strukturen.

Pos.	As.	P_α	Klasse		P_β	Klasse
1	Ser	0.79	i_α		0.72	b_β
2	Tyr	0.61	b_α		1.29	h_β
3	Ser	0.79	i_α		0.72	b_β
4	Met (Val)	1.20 /1.14)	$h_\alpha(h_\alpha)$		1.67 (1.65)	$H_\beta(H_\beta)$
5	Glu (-)	1.53	H_α	$\langle P_\alpha \rangle_{2-9}=1.05$	0.26	B_β
6	His (+)	1.24	h_α		0.71	b_β
7	Phe	1.12	h_α		1.28	h_β
8	Arg (+)	0.79	i_α		0.90	i_β
9	Trp	1.14	h_α		1.19	h_β
10	Gly	0.53	B_α		0.81	i_β
11	Lys (+)	1.07	I_α		0.74	b_β
12	Pro	0.59	B_α		0.62	b_β
13	Val	1.14	h_α		1.65	H_β
14	Gly	0.53	B_α		0.81	i_β
15	Lys (+)	1.07	I_α		0.74	b_β
16	Lys (+)	1.07	I_α		0.74	b_β
17	Arg (+)	0.79	i_α		0.90	i_β
18	Arg (+)	0.79	i_α		0.90	i_β
19	Pro	0.59	B_α		0.62	b_β
20	Val	1.14	h_α		1.65	H_β
21	Lys (+)	1.07	I_α		0.74	b_β
22	Val	1.14	h_α		1.65	H_β
23	Tyr	0.61	b_α		1.29	h_β
24	Pro	0.59	B_α		0.62	b_β

25	Asp (-)	0.98	i_α		0.80	i_β
26	Ala	1.45	H_α		0.97	I_β
27	Gly	0.53	B_α		0.81	i_β
28	Glu (-)	1.53	H_α		0.26	B_β
29	Asp (-)	0.98	i_α	$\langle P_\alpha \rangle_{25-34} = 1.19$	0.80	i_β
30	Gln	1.17	h_α		1.23	h_β
31	Ser	0.79	i_α		0.72	b_β
32	Ala	1.45	H_α		0.97	I_β
33	Glu (-)	1.53	H_α		0.26	B_β
34	Ala	1.45	H_α		0.97	I_β
35	Phe	1.12	h_α		1.28	h_β
36	Pro	0.59	B_α / I_α		0.62	b_β
37	Leu	1.34	H_α		1.22	h_β
38	Glu (-)	1.53	H_α		0.26	B_β
39	Phe	1.12	h_α		1.28	h_β

Tab. 7: Aminosäuresequenz von ACTH (Mensch) mit den entsprechenden P_α - und P_β-Parametern (18, 19)

Pos.	As.	P_α	Klasse		P_β	Klasse
1	Pro	0.59	I_α		0.62	b_β
2	Ala	1.45	H_α		0.97	I_β
3	Ala	1.45	H_α		0.97	I_β
4	Val	1.14	h_α		1.65	H_β
5	Glu (-)	1.54	H_α	$\langle P_\alpha \rangle_{2-9} = 1.23$	0.26	B_β
6	His (+)	1.24	h_α		0.71	b_β
7	Phe	1.12	h_α		1.28	h_β
8	Arg (+)	0.79	i_α		0.90	i_β
9	Trp	1.14	h_α		1.19	h_β
10	Gly	0.53	B_α		0.81	i_β

Tab. 8: Aminosäuresequenz und entsprechende P_α - und P_β-Parameter des $\left[Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4\right]$ Corticotropin-(1-10)-dekapeptids (18, 19).

Werden die von Chou und Fasman (18, 19) ausgearbeiteten Regeln zur Vorhersage von Sekundärstrukturen in Proteinen (siehe Kap. III.4.2.) auf diese Sequenz angewendet, so ergibt sich folgendes:

Entlang der Peptidkette existieren 2 Helixnukleationszentren, das eine im Bereich der Aminosäuren 4-9 (beim Analogen zwischen 2 und 7), das andere im Bereich 29-34. Insgesamt umfaßt der helikale Bereich am N-Terminus die Aminosäuren 2-9 des ACTH und des $\left[Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4\right]$-Analogen (siehe Tab.8). Die $\langle P_\alpha \rangle_{2-9}$-Werte liegen bei 1.05, für das Analoge bei 1.23, und sind somit größer als die geforderten 1.03; die entsprechenden $\langle P_\beta \rangle_{2-9}$ liegen bei 1.00 und 0.99, sind also beide kleiner als die zugehörigen $\langle P_\alpha \rangle_{2-9}$-Werte. Das zweite Nukleationszentrum im Bereich der Aminosäuren 29-34 erstreckt sich in N-terminaler Richtung bis zur Aminosäure Asp (Pos.25), Pro in Position 24 unterbricht die α-Helix. In C-terminaler Richtung wird die Helix ebenfalls durch Pro, in Position 36, unterbrochen. Der zweite helikale Bereich umfaßt somit die Aminosäuren 25-34. Der zugehörige $\langle P_\alpha \rangle$-Wert von 1.19 liegt deutlich über 1.03 und dem entsprechenden $\langle P_\beta \rangle$-Wert von 0.78.

ß-Faltblattstrukturen werden für die ACTH-Sequenz nicht vorhergesagt. Das Mittelstück mit den Aminosäuren 10-24 enthält in regelmäßiger Folge insgesamt 7 Faltblattbrecher (Lys, Pro), die die Ausbildung einer ß-Struktur äußerst unwahrscheinlich machen. Ebenso ungünstig ist hier die Ausbildung einer α-Helix, da von 15 Aminosäureresten 6 Helixbrecher sind, die über den ganzen Bereich verteilt sind, und da außerdem von den restlichen Aminosäuren nur 3 mittelstarke und 4 schwache Helixbildner sind.

Wird die Sequenz auf das mögliche Vorkommen von "ß turns" untersucht, indem die p_t-, $\langle P_t \rangle$-, $\langle P_\alpha \rangle$- und $\langle P_\beta \rangle$-Werte aller Tetrapeptide berechnet werden, so ergibt sich, daß die Sequenzen 14-17 und 23-26 eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Bildung von "ß turns" aufweisen (siehe Tab. 9).

Pos.	As.	f_i	f_{i+1}	f_{i+2}	f_{i+3}	P_t	
14	Gly	0.104				1.68	
15	Lys (+)		0.080			1.01	$p_t = 0.56.10^{-4}$
16	Lys (+)			0.067		1.01	$\langle P_t \rangle = 1.18$
17	Arg (+)				0.101	1.00	
23	Tyr	0.136				1.25	
24	Pro		0.272			1.54	$p_t = 0.74.10^{-4}$
25	Asp (-)			0.069		1.26	$\langle P_t \rangle = 1.16$
26	Ala				0.029	0.57	

Tab. 9: "ß turn"-Potentiale P_t für die Segmente $ACTH^{14-17}$ und $ACTH^{23-26}$

Das Segment Gly-Lys-Lys-Arg erfüllt mit $\langle P_\alpha \rangle = 0.87$, $\langle P_\beta \rangle = 0.80$, $\langle P_t \rangle = 1.18$ und $p_t = 0.56.10^{-4}$ die Bedingungen, die für das Vorliegen eines "ß turns" nötig sind. Beim Segment Tyr-Pro-Asp-Ala sind zwar $\langle P_\beta \rangle = 0.88$ $\langle P_t \rangle = 1.16$ und $p_t = 0.74.10^{-4} > 0.5.10^{-4}$, das α-Potential mit 0.91 jedoch über dem erlaubten Grenzwert von 0.90.

Somit ergibt sich für die ACTH-Sequenz folgende Vorhersage: Die Segmente 2-9 und 25-34 besitzen helikale Struktur (46% der Gesamtsequenz), das Segment 14-17 liegt als "ß turn" vor (10%) und die Segmente 10-24 sowie 35-39 liegen in einer ungeordneten, auch irregulär bezeichneten Struktur vor (44%).

b) Tanaka-Scheraga-Schema

Nach Tanaka und Scheraga (21-23) werden die relativen Wahrscheinlichkeiten der Triaden und Tetraden für die Coil-, Helix-

und ausgestreckten Strukturen $P^*_{(i/3/c)}$, $P^*_{(i/3/\alpha)}$, $P^*_{(i/4/c)}$ und $P^*_{(i/4/\varepsilon)}$ von den $[Val^4]$-ACTH-Teilsequenzen 1-10, 11-23, 1-23, sowie von der ganzen ACTH-Sequenz* berechnet (zur Berechnung siehe Kap. III.4.2.2.). In Tab. 10 sind die P*-Werte des $[Val^4]$ Corticotropin-(1-23)- tricosapeptids aufgeführt. Außerdem wird für das $[Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4]$-Analoge eine Berechnung für das N-terminale Dekapeptid (siehe Tab. 11), sowie für die Gesamtsequenz 1-39 durchgeführt.

Die erste Zuordnung der Sequenz zu Coil-, α-Helix- und ß-Struktur, die sich durch Vergleich von $P^*_{(i/3/c)}$ mit $P^*_{(i/3/\alpha)}$ und $P^*_{(i/4/c)}$ mit $P^*_{(i/4/\varepsilon)}$ nach definierten Regeln ergibt (23), ist ebenfalls in Tab. 10 sowie in Tab. 11 enthalten. Starke elektrostatische Abstoßung, wie sie zwischen den gleichgeladenen Resten i und i+3, sowie i und i+4 auftreten, verhindern die Ausbildung einer α-Helix im Bereich 8-21, sowie 25-33, wodurch die in erster Zuordnung vorhergesagten α-Helixbereiche 19-22 beim Val^4-α^{1-23}-ACTH, 14-17 beim α^{11-23}-ACTH sowie 27-35 beim α^{1-39}-ACTH ausgeschlossen werden. Die sich unter Hinzunahme weiterer Regeln (z.B. Einbeziehung weiterreichender Wechselwirkungen) ergebende Konformationszuordnung für sämtliche hier berechnete Sequenzen ist in Tab. 12 aufgeführt.

---

* Da sich die relativen Wahrscheinlichkeiten P* nicht durch Addition von statistischen Gewichten ergeben, sondern die Sequenz als Ganzes in die Berechnung eingeht, verändern sich die P*-Werte der Triaden und Tetraden und damit die Konformationsvorhersage (siehe dazu Diskussion in Kap. III.5.).

			α-Helix			ausgestreckte Konformation			
i	As	La-dung	P*(i/3/α)	1.Zuord.	P*(i/3/c)	P*(i/4/ε)	1.Zuord.	P*(i/4/c)	K+
1	Ser		0.2684		1.143	1.129		0.8647	
2	Tyr		1.410		0.7883	1.192		0.8542	
3	Ser		2.969		0.8906	0.7749	1-5	0.9774	
4	Val		2.137	2-8	0.8916	0.9869		0.9160	2-8
5	Glu	-	1.283		1.211	0.5136		1.262	
6	His	+	1.069		1.166	0.7620		1.112	
7	Phe		0.9078		1.013	0.6567		1.145	
8	Arg	+	0.6396		1.115	0.5500		1.205	
9	Trp		0.3950		1.156	0.5977		1.172	
10	Gly		0.8343		1.231	0.8904		0.9318	
11	Lys	+	0.5477		0.8235	0.8887		0.9300	
12	Pro		0.6949		0.8614	0.8894		0.9307	
13	Val		0.5638		0.9172	0.7197		0.9913	
14	Gly		1.785		1.311	0.3748		1.367	
15	Lys	+	0.9383	14-16	1.208	0.5277		1.259	
16	Lys	+	0.5120		1.166	0.6519		1.182	
17	Arg	+	0.4470		1.094	1.425		0.8282	
18	Arg	+	0.6441		0.7944	1.254		0.8585	
19	Pro		1.644		0.8234	2.411		0.6235	
20	Val		1.046	19-22	0.6144	2.806		0.5894	
21	Lys	+	0.2642		0.7794		17-23		17-23
22	Val								
23	Tyr								

+ In Spalte k ist die endgültige Konformationsvorhersage nach Einbeziehung weiterer Regeln (siehe Text) enthalten.

Tab. 10: Zuordnung von α-helikalen und ausgestreckten (extended) Konformationsbereichen für das Val^4- α^{1-23}-ACTH

			α-Helix			ausgestreckte Konformation			
i	As	La-dung	P*(i/3/α)	1.Zuord.	P*(i/3/c)	P*(i/4/ε)	1.Zuord.	P*(i/4/c)	K+
1	Pro		2.477		0.8654	2.166		0.6640	
2	Ala		1.843		0.6447	1.736		0.7088	
3	Ala		1.373	1-5	0.7747	0.9846	1-5	0.8626	$1\text{-}5_{\alpha}$
4	Val		0.9173		0.9432	0.7137		0.9831	
5	Glu	-	0.5311		1.282	0.3715		1.355	
6	His	+	0.4060		1.235	0.5514		1.194	
7	Phe		0.3174		1.073	0.4761		1.232	
8	Arg	+	0.1359		1.183				
9	Trp								
10	Gly								

+ In Spalte K ist die endgültige Konformationsvorhersage enthalten

Tab. 11: Zuordnung von Sekundärstrukturbereichen für $[Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4]\text{-}\alpha^{1\text{-}10}\text{-ACTH}$

Sequenz	Bereich	Konformation
Val^4- α^{1-23}-ACTH	2 - 8	α
	17 - 23	ε
Val^4- α^{1-10}-ACTH	2 - 6	α
Val^4-α^{11-23}-ACTH	17 - 23	ε
Val^4- α^{1-39}-ACTH+	3 - 6	α
	17 - 24	ε
	31 - 39	ε
Pro^1,Ala^2,Ala^3,Val^4- α^{1-10}-ACTH	1 - 5	α

+ Die Substitution von Val in Pos. 4 hat keinen Einfluß auf die P*-Werte und die Konformationsvorhersage

Tab. 12: Konformationszuordnung für die berechneten ACTH-Sequenzen

5. Diskussion der Konformationsuntersuchungen

Die Ergebnisse der Konformationsuntersuchungen sind in Tab. 13 zusammenfassend dargestellt.

Sequenz	LM	ermittelte Konformation nach CD-Daten	Vorhersage nach Fasman	Scheraga
Val^4-α^{1-10}-ACTH	H_2O	ß-Struktur	2 - 9 α-Helix	2 - 6 α-Helix
	TFE	≃ 10 % α-Helix	(P_α = 1.05)	
Pro^1,Ala^2,Ala^3-Val^4-α^{1-10}-ACTH	H_2O	0 - 5% α-Helix	2 - 9 α-Helix	1 - 5 α-Helix
	TFE	20% α-Helix	(P_α = 1.23)	
Val^4-α^{11-23}-ACTH	H_2O	0 - 5% α-Helix	14 - 17 ß-Turn	17-23 ε (extended)
	TFE	≃ 20% α-Helix		
Val^4-α^{11-23}-ACTH (ε-Z-Lys-geschützt)	TFE	30% α-Helix		14 - 17 α-Helix 18-23 ε (extended)

Tab. 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der Konformationsuntersuchung

Ein Vergleich der experimentellen Ergebnisse aus den CD-Messungen mit den theoretischen Vorhersagen ergibt für die in dieser Arbeit untersuchten ACTH-Sequenzen folgendes Bild:

a) Val^4-α^{1-10}-ACTH und Pro^1,Ala^2,Ala^3,Val^4-α^{1-10}-ACTH

Beim Val^4-Analogen ist der drastische Konformationswechsel beim Übergang vom organischen in wässriges Medium die hervorstechende Eigenschaft. Das Vorliegen von ca. 10% α-Helixstruktur in TFE stimmt gut mit den Vorhersagen überein. Beide hier angewandten Vorhersageschemata ergeben, daß die

Sequenz 2-9 (Fasman), bzw. 2-6 (Tanaka und Scheraga) α-Helixstruktur besitzen. Eine quantitative Gegenüberstellung des experimentell gefundenen (≈ 10 %) mit dem theoretisch vorhergesagten Gehalt an Helixstruktur (50-80%) ist bei derart kurzen Peptidsequenzen unmöglich: Sowohl Endgruppeneffekte als auch das Fehlen stabilisierender "long range"-Wechselwirkungen sprechen gegen die Ausbildung stabiler Helixstrukturen. Diese Effekte zeigen sich besonders deutlich beim analogen Dekapeptid, das am Kettenende besonders starke Helixbildner besitzt (Pro^1-Ala^2-Ala^3): Obwohl durch den Austausch der drei N-terminalen Aminosäuren der $\langle P_\alpha \rangle_{2-9}$-Wert von 1.05 auf 1.23 ansteigt (vgl. Tab. 7 bzw. Tab. 8) und somit eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer α-Helixstruktur vorausgesagt wird, liegt diese Sequenz im Helix fördernden Medium TFE lediglich zu 20% als α-Helix vor. Ein Vergleich mit der Oligo-(L-Glu)-Reihe zeigt jedoch, daß dieses Ergebnis durchaus zu erwarten ist: Selbst Deka-(L-Glu), das die höchsten $\langle P_\alpha \rangle$-Werte besitzt, liegt nur zu 25% in der α-helikalen Form vor (156). Dieser Helixgehalt scheint somit eine obere Grenze für eine Kettenlänge von 10 Aminosäuren zu sein. In Anbetracht dieser Befunde ist festzustellen, daß sich die Vorhersage einer hohen Tendenz zur Ausbildung einer α-Helix für die beiden Dekapeptide experimentell bestätigen ließ.

Beim Übergang zum wässrigen Medium geht die teilhelikale Struktur des Val^4-α^{1-10}-ACTH in eine ß-Struktur über. Dieser drastische Konformationswechsel kommt bei einer genaueren Analyse der Vorhersagen nicht überraschend; die P*-Werte für die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer "ausgestreckten" Konformation sind ebenfalls größer als 1, während die P*-Werte für die Coil-Struktur relativ tief liegen. Dieses Beispiel verdeutlicht die Rolle des Lösungsmittels besonders eindrücklich. Allgemein läßt sich feststellen, daß besonders bei kurzkettigen Peptiden mit ähnlichen relativen Wahrscheinlich-

keiten für α- bzw. ß-Strukturen die tatsächliche Konformation weitgehend vom Lösungsmittel bestimmt wird. Da das Helix fördernde TFE die native Umgebung einer Sequenz im natürlichen Proteinverband realistischer widerspiegelt als Wasser, ist in organischem Milieu eine bessere Übereinstimmung zwischen Experiment und Theorie zu erwarten. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Hypothese weitgehend.

Interessant ist die Tatsache, daß der beim Val^4-Dekapeptid gefundene Übergang von der teilhelikalen Struktur zur ß-Struktur beim Pro^1,Ala^2,Ala^3-Analogen nicht stattfindet. Hier wird lediglich die zu erwartende starke Erniedrigung des Helixgehalts in Wasser gefunden. Dieses Verhalten läßt sich durch die Anwesenheit des N-terminalen Prolinrestes erklären: Prolin besitzt ein außergewöhnlich stark ausgeprägtes asymmetrisches Nukleationsverhalten. Während Prolin niemals im Innern einer Helix vorkommen kann (also helixbrechend ist mit $v_C^{(h)*} = 0.0!$), wirkt es am N-Terminus eines Segments stark Helix induzierend ($v_N^{(h)*} = 0.0846$) (21). Diese spezifische Rolle von Prolin läßt sich aus den nachbarschaftsabhängigen Konformationsenergiediagrammen leicht ableiten (10). Die vorhergesagte starke Helix induzierende Wirkung des N-terminalen Prolin äußert sich somit

i) im signifikanten Anstieg des Helixgehaltes des Pro^1, Ala^2, Ala^3-Analogen gegenüber dem Val^4-Analogen
ii) in dem ebenso deutlichen Anstieg des helikalen Anteils beim Übergang vom Nona- (ohne Pro) zum Dekapeptidanalogen (mit Pro)
iii) in der Tatsache, daß selbst in wässriger Lösung Restanteile einer α-Helix erhalten bleiben.

Die experimentellen und theoretischen Befunde sprechen dafür, daß die Anteile an Sekundärstruktur im ACTH vorwiegend im N-terminalen Bereich liegen. Der Helixgehalt erhöht sich signifikant, wenn das N-terminale Tripeptid durch starke Helixbildner substituiert wird.

b) α^{11-23}-ACTH

Dieses stark basische Peptid besitzt nach den CD-Untersuchungen nur sehr wenig Sekundärstruktur: In Wasser liegt der Helixgehalt unter 5, in TFE unter 10%. Diese Ergebnisse decken sich voll mit den Vorhersagen: Nach beiden Schemata wird kein Helixbereich gefunden. Zwar ergeben sich beim Vorgehen nach Tanaka und Scheraga bei der ersten Zuordnung (die nur direkte nachbarschaftsabhängige Wechselwirkungen berücksichtigt) P^*_α -Werte > 1 für die Sequenz 14-17, bei Berücksichtigung von weiterreichenden Coulomb'schen Wechselwirkungen zwischen den Resten i und i+3 bzw. i und i+4 tritt eine Destabilisierung der Helix ein, sodaß sich keine Sekundärstruktur ausbilden kann. Lediglich für den Bereich 17-23 wird nach diesen Berechnungen eine ausgestreckte Konformation (die nicht identisch sein muß mit einer intermolekularen ß-Struktur) vorausgesagt. Da sich solche Strukturen nicht notwendigerweise im CD-Spektrum erkennen lassen, gibt es für die Existenz dieser Sekundärstruktur keine weiteren Indizien.

Äußerst aufschlußreich hinsichtlich der Vorhersage einer Helixstruktur ohne Einbeziehung der Coulomb'schen Abstoßung zwischen den positiv geladenen Seitengruppen sind die CD-Untersuchungen der geschützten Sequenz 11-23. Tatsächlich wird in diesem Falle im Helix fördernden Medium (TFE) ein hoher Gehalt an α-Helixstruktur gefunden. Der von der Theorie vorhergesagte Helixanteil von ca. 30% deckt sich exakt mit dem experimentell ermittelten Wert von 30%. Diese gute Übereinstimmung von Theorie und Experiment zeigt deutlich eine besondere Stärke des Tanaka-Scheraga-Modells: Durch stufenweise Einbeziehung weiterreichender Wechselwirkungen zur Ermittlung der relativen Wahrscheinlichkeiten für eine spezifische Konformation und Sequenz lassen sich ohne zusätzlichen Rechenaufwand auch Aussagen machen über die Konformation Seitengruppen-geschützter Sequenzen (unter der Annahme, daß sich die Schutzgruppen sterisch nicht aus-

wirken, was in erster Näherung durchaus zulässig erscheint).

c) Val^4- α^{1-23}-ACTH und Val^4- α^{1-39}-ACTH

Aus den experimentellen Befunden läßt sich ableiten, daß die biologisch vollaktive Sequenz 1-23 überwiegend als ungeordnetes Knäuel vorliegt. Der gefundene Anteil an Helixstruktur liegt in der Größenordnung von 10-15%, der im N-terminalen Bereich konzentriert ist. Diese Ergebnisse werden von den theoretischen Vorhersagen weitgehend unterstützt. Die Bereiche mit Sekundärstruktur lassen sich mit Hilfe der berechneten Wahrscheinlichkeiten näher spezifizieren:

Die Sequenz 1-23 besitzt (berechnet nach Tanaka-Scheraga) im Bereich 2-8 α-Helixstruktur*, für das Teilstück 17-23 wird eine ausgestreckte Konformation vorausgesagt.

Bei der Berechnung der vollständigen ACTH-Sequenz 1-39 werden neben dem α-helikalen Segment 3-6 zwei Bereiche mit ausgestreckter Konformation vorausgesagt, die Segmente 17-24 bzw. 31-39. Nach Chou und Fasman ergeben sich für die Segmente 2-9 und 25-34 α-Helixstruktur und für die Sequenz 14-17 ein "ß turn".

Insgesamt ergibt sich somit folgendes Bild:
Der geringe Anteil an Helixstruktur im ACTH liegt nach beiden Vorhersageschemata im N-terminalen Bereich.

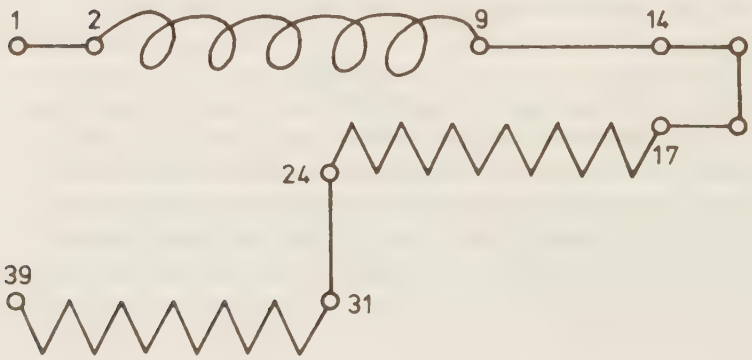
---

* Die Erweiterung des α-helikalen Bereichs um 2 Aminosäurereste gegenüber der Berechnung des Teilstücks 1-10 ist eine Folge des mathematischen Mechanismus zur Generierung der Wahrscheinlichkeiten P*: Im Gegensatz zum Vorgehen nach Fasman-Chou werden hier keine absoluten, sondern relative Wahrscheinlichkeiten ermittelt, die von der Länge der in Betracht gezogenen Sequenz abhängen. Siehe dazu auch Fußnote auf Seite 105.

Diese Vorhersagen werden durch die hier durchgeführten CD-Untersuchungen voll unterstützt. Der Anteil an α-Helixstruktur beträgt 10-15% und liegt im Bereich der Sequenz 2-9. Das C-terminale Segment 25-39 liegt nach den Vorhersagen in relativ ausgestreckter Form vor. Ob diese Konformation identisch mit einer ß-Struktur ist, läßt sich im Augenblick noch nicht entscheiden. Auf der Basis der hier durchgeführten Untersuchungen ist für die Konformation des ACTH folgendes Modell wahrscheinlich:

Segment	Struktur
2 - 9	α-Helix
14 - 17	"ß turn"
18 - 24	ausgestreckt
31 - 39	ausgestreckt

ACTH ist demnach ein relativ flexibles Kettenmolekül mit geringer Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturbereichen. Diese liegen bevorzugt am N-Terminus der Kette. Der C-Terminus besitzt ausgestreckte Konformation. Hieraus ergibt sich folgende schematische Darstellung:



6. Schlußfolgerung

Aus den Ergebnissen der experimentellen und theoretischen Konformationsuntersuchungen lassen sich folgende allgemeine Schlüsse ziehen:

1. Zur Ausbildung von Sekundärstrukturen ist eine kritische Kettenlänge notwendig. Diese liegt bei der α-Helix im Bereich von 7-10, bei der ß-Struktur bei 6-7 Aminosäureresten. Zur Stabilisierung der helikalen Bereiche sind weitreichende Wechselwirkungen, wie sie nur in Proteinen vorkommen, notwendig.
2. Das Kettenende besitzt entscheidenden Einfluß auf die Konformation des Peptids: Sämtliche hier untersuchten Peptide zeigen in der N-geschützten bzw. ungeschützten Form zum Teil drastische Unterschiede in ihren CD-Spektren, wobei die N-ungeschützte Form häufig ß-Struktur einnimmt.
3. Die Vorhersageschemata sind geeignet, die Tendenz zur Ausbildung geordneter Strukturen zu ermitteln. Die Sekundärstrukturbereiche lassen sich relativ exakt festlegen. Daraus kann die Gerüstkonformation eines Proteins bei gegebener Primärsequenz ermittelt werden.
4. Das von Tanaka und Scheraga entwickelte "3-Zustandsmodell" zur Vorhersage von Gerüstkonformationen ist dem rein empirischen Chou-Fasman-Modell überlegen. Allerdings ist der Rechenaufwand dieser statistisch-mechanischen Behandlung erheblich größer.
5. Da Einflüsse des Kettenendes sowie des Lösungsmittels nicht berücksichtigt werden, ist eine quantitative Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment bei kurzkettigen - und damit flexiblen - Peptiden nicht zu erwarten. Eine eindeutige Zuordnung des Sekundärstrukturtypus ist vor allem bei ähnlichen $\langle P_\alpha \rangle$ - und $\langle P_\beta \rangle$ -Werten problematisch. In diesem Falle können weitreichende Wechselwirkungen den Ausschlag bei der Ausbildung der spezifischen Konformation geben.

6. Da die statistischen Gewichte, die die Grundlage der Vorhersageschemata bilden, aus Röntgenstrukturdaten von Proteinen erhalten wurden, führt die Korrelation mit experimentellen Untersuchungen zu größerer Übereinstimmung, wenn Messungen in nichtwässrigen Medien durchgeführt werden, da diese die natürliche Umgebung im Proteinverband besser widerspiegeln.

IV. BERECHNUNGEN ZU DISTANZMESSUNGEN DURCH FLUORESZENZEMISSIONSSPEKTROSKOPIE

1. Allgemeines zur Methode

Die Bestimmung des strahlungslosen Energieübergangs zwischen 2 Chromophoren durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie kann zur Bestimmung von Moleküldimensionen, d.h. intramolekularen Abständen zwischen chromophoren Gruppen herangezogen werden (196, 198). Bei synthetischen Peptiden können geeignete Chromophore in die Kette eingebaut werden, sodaß aus der Messung intramolekularer Abstände im Molekül auf die Flexibilität bzw. das Vorliegen geordneter Strukturen geschlossen werden kann. Die Methode ist vor allem bei kurzkettigen Peptiden sehr wertvoll, bei denen die sonst angewendeten Methoden zur Konformationsuntersuchung wie Messung des CD oder NMR-Spektroskopie wegen Endgruppeneffekten häufig schwierig zu interpretieren sind und das Molekulargewicht für die Anwendung von Lichtstreuungs- und Viskositätsmessungen zur Bestimmung von Moleküldimensionen zu klein ist.

So wurden 1969 von J. Eisinger die Dimensionen von ACTH-Sequenzen mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Methoden, bzw. des dadurch bestimmten Energie-Transfers untersucht (178, 197). Die hier untersuchte Sequenz $ACTH_{1-23}$ enthält 2 Tyrosinreste in Position 2 und 23 und einen Tryptophanrest in Position 9. Da die Abstände zwischen den Chromophoren Tyr und Trp konformationsabhängig sind, können daraus Rückschlüsse auf die Konformation gezogen werden.

Voraussetzung für die Anwendung fluoreszenzspektroskopischer Methoden zur Bestimmung intramolekularer Abstände ist das Vorhandensein von 2 chromophoren Gruppen, wobei das Emissionsspektrum der einen Gruppe (Donor) mit dem Absorptionsspektrum der anderen Gruppe (Akzeptor) überlappen muß.

Die exakte Theorie des Resonanztransfers von elektronischer Anregungsenergie zwischen isolierten Donor- und Akzeptormolekülen mit geeigneten spektroskopischen Charakteristiken wurde von Th. Förster bereits 1948 erarbeitet (196). Die Theorie wurde zunächst mit Erfolg auf das Phänomen der Fluoreszenzlöschung der Donorfluoreszenz in Lösungen von Donor- und Akzeptorfarbstoffmolekülen angewandt. Später konnte die vorausgesagte Abhängigkeit der Transferate von r^{-6} (r = intramolekulare Donor-Akzeptor-Distanz) in mehreren Laboratorien nachgewiesen werden (192, 199, 200). Von diesem Zeitpunkt an fand die Methode immer häufiger Anwendung zur Bestimmung intramolekularer Abstände in der Größenordnung von 10-60 Å bei Biopolymeren (177, 179, 185, 195).

Prinzip der Methode:

Ein elektronisch angeregtes Chromophor kann außer durch Emission eines Lichtquants oder durch strahlungslose Desaktivierung seine Anregungsenergie nach einem strahlungslosen Mechanismus auf ein benachbartes Chromophor übertragen. Der angeregte Akzeptor gibt nun im günstigsten Falle die übertragene Energie teilweise als messbare Fluoreszenzstrahlung ab, deren Intensität ein Maß für den erfolgten Energietransfer und für die Distanz zwischen Donor und Akzeptor ist. Der Vorgang des Energietransfers konkurriert direkt mit den anderen Desaktivierungsprozessen wie Emission und strahlungslose Desaktivierung. Die dazugehörige Geschwindigkeitskonstante ist folgendermaßen definiert:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{Ro}{R} \right)^6$$

mit τ_D^{-1} = Inverses der Lebensdauer des angeregten Zustandes (= Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller Desaktivierungsprozesse in Abwesenheit eines Akzeptors)

R = Distanz zwischen Donor und Akzeptor

Ro = "Förster-Distanz" = Abstand bei dem 50% Energietransfer stattfindet.

Die Energietransferrate, bzw. die "transfer efficiency" ist definiert als:

$$T = \frac{K_T}{\tau_D^{-1} + K_T} = \frac{R_o^6}{R_o^6 + R^6}$$

mit $R_o^6 = 8.785.10^{-25} . \varkappa^2 . \phi_D . n^{-4} . J(\tilde{\nu})$

wobei ϕ_D = Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

n = Brechungsindex des Mediums

$J(\tilde{\nu})$ = Überlappungsintegral des normalisierten Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors

$\varkappa^2$ = Orientierungsfaktor für die Dipol-Dipol Wechselwirkung

$\varkappa^2$ drückt den Einfluß der gegenseitigen Orientierung von Donor, Akzeptor und vom Abstandsvektor zwischen den beiden auf die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers aus. Wie aus der Definition von $\varkappa^2$ hervorgeht (s. unten, 2.1. Gl. (10)), kann $\varkappa^2$ Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Bei gleicher Wahrscheinlichkeit und Vorkommen aller Orientierungen ergibt sich als Durchschnittswert für $\langle \varkappa^2 \rangle \frac{2}{3}$.

Diese Größe enthält einige Problematik, da über ihren genauen Wert im allgemeinen nichts bekannt ist. Meistens wird argumentiert, daß zwischen den Chromophoren eine genügend große Zahl mehr oder weniger frei rotierbarer Bindungen liege, die eine Zufallsorientierung der Übergangsmomente der Chromophoren gewährleisten. Bisher wurde diese Annahme bei der Bestimmung des Energietransfers als gegeben vorausgesetzt.

Im folgenden wird nun untersucht, ob diese Annahme grundsätzlich auf Peptidketten übertragen werden kann. Dabei wird der Orientierungsfaktor $\langle \varkappa^2 \rangle$ in Abhängigkeit von der

Kettenlänge, der Flexibilität und der Konformation der Peptidkette systematisch untersucht. Dazu werden statistisch-mechanische Durchschnittsgrößen, die von der Konformation abhängen, wie z.B. der End-zu-End-Abstand $\langle r \rangle$ zwischen Chromophoren berechnet. Die Berechnungen werden an einer Modellkette durchgeführt, bei der zwischen die Chromophoren Tyrosin und Tryptophan (wie im ACTH) eine steigende Zahl von Aminosäureresten eingebaut werden.

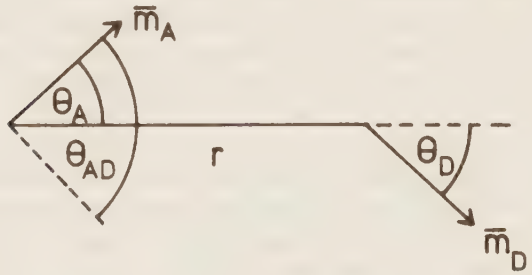
2. Berechnungen des Orientierungsfaktors $\langle \varkappa^2 \rangle$

2.1. Grundlagen der Berechnung

Der Orientierungsfaktor $\langle \varkappa^2 \rangle$ ist wie folgt definiert:

$$\langle \varkappa^2 \rangle = \left\langle \left[\cos \theta_{AD} - 3 \cos \theta_A \cdot \cos \theta_D \right]^2 \right\rangle \qquad (10)$$

wobei sich θ aus der gegenseitigen Orientierung der Übergangsmomente (Vektor $\bar{m}_A$ bzw. $\bar{m}_D$) ergibt:



Spitze Klammern bedeuten, daß sich die entsprechende Größe aus dem statistisch-mechanischen Durchschnitt über alle Konformationen des Moleküls ergibt. Für Zufallsorientierung der Übergangsmomente ("random orientation") ist $\langle \varkappa^2 \rangle = 2/3 . \langle \varkappa^2 \rangle$ läßt sich alternativ ausdrücken als:

$$\langle \varkappa^2 \rangle = \left\langle \left[\bar{m}_A . \bar{m}_D - \frac{3(\bar{m}_A . \bar{r})\ (\bar{m}_D . \bar{r})}{r^2} \right]^2 \right\rangle =$$

$$\left\langle (\bar{m}_A . \bar{m}_D)^2 - \frac{6(\bar{m}_A . \bar{r})(\bar{m}_D . \bar{r})(\bar{m}_A . \bar{m}_D)}{r^2} + \frac{9\left[(\bar{m}_A . \bar{r})(\bar{m}_D . \bar{r})\right]^2}{r^4} \right\rangle \qquad (11)$$

wobei $\bar{m}_A$ dem Übergangsmoment des Akzeptors, $\bar{m}_D$ dem Übergangsmoment des Donors und $\bar{r}$ dem End-zu-End-Vektor zwischen den Chromophorenzentren entspricht. Entsprechend Abb. 30 lassen sich die einzelnen Größen von Gleichung (11) wie folgt berechnen (die Werte für die Bindungswinkel und Bindungslängen sind in Tab. 14 angegeben.

$\bar{m}_D$ = Einheitsvektor des Donorübergangsmoments für den ^1L_b-Übergang (224, 225)

$\bar{m}_A$ = Einheitsvektor des Akzeptorübergangsmoments für den ^1L_a-Übergang (224, 225)

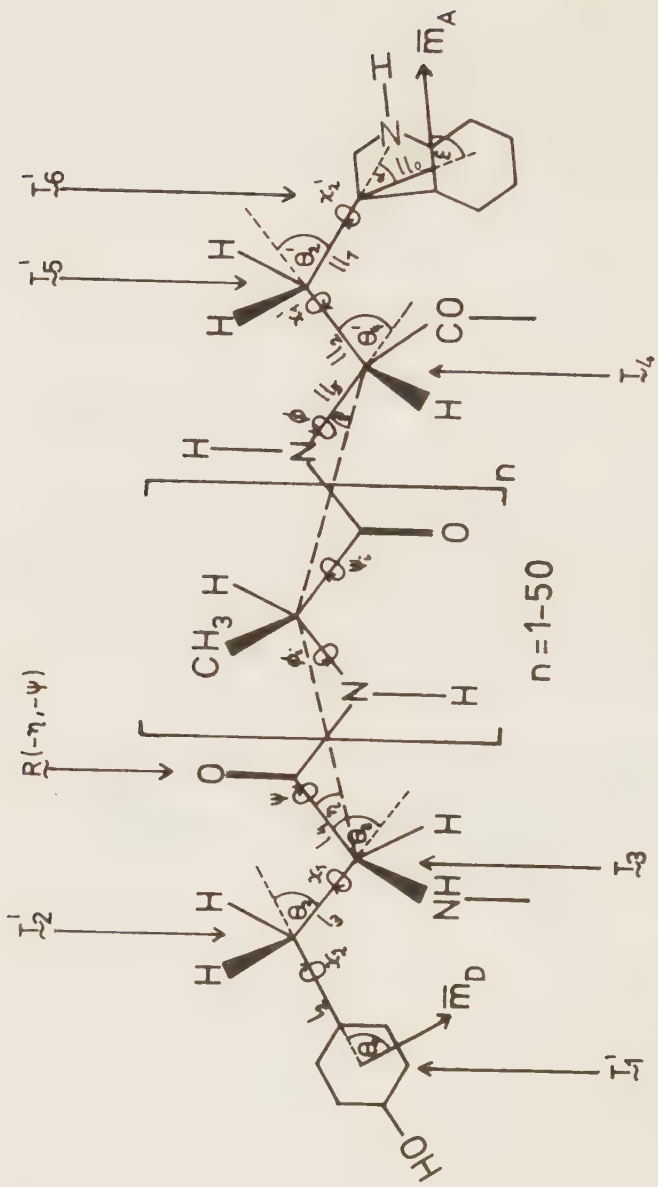


Abb. 30: Peptidgerüst mit endständiger Donor- und Akzeptorgruppe

l_1	= 1.0 Å		Θ_1	= 90°	
l_2	= 2.94 "	(188)	Θ_2	= 67°	(188)
l_3	= 1.54 "	(188)	Θ_3	= 70°	(10)
l_4	= 1.53 "	(10)	ε	= 51°	(223)
ll_o	= 1.75 "	(223)	α	= 33.15°	(223)
ll_1	= 1.53 "	(223)	Θ_2'	= 65°	(223)
ll_2	= 1.51 "	(223)	Θ_4'	= 69°	(223)
ll_5	= 1.47 "	(10)			

Tab. 14: Bindungslängen und Bindungswinkel

$$\bar{m}_A \cdot \bar{m}_D = \cos\Theta_{AD} = \underset{\sim}{TL} \cdot \underset{\sim}{T}_J'(\Theta_1,0) \cdot \underset{\sim}{T}_2'(\Theta_2,\chi_2) \cdot \underset{\sim}{T}_3 \cdot (\underset{\sim}{T}_i)^n \cdot \underset{\sim}{T}_4 \cdot \underset{\sim}{T}_5' \cdot (\Theta_2',\chi_1') \cdot \underset{\sim}{T}_6'(\alpha,\chi_2') \cdot \underset{\sim}{TN} \qquad (12)$$

wobei

$$\underset{\sim}{T}' = \begin{bmatrix} \cos\Theta_i & \sin\Theta_i & 0 \\ \sin\Theta_i \cdot \cos\phi_i & -\cos\Theta_i \cdot \cos\phi_i & \sin\phi_i \\ \sin\Theta_i \cdot \sin\phi_i & -\cos\Theta_i \cdot \sin\phi_i & -\cos\phi_i \end{bmatrix} \qquad (13)$$

$$\underset{\sim}{T}_i = R(\xi,0) \cdot R(\Theta^\alpha, \pi - \varphi_i) \cdot R(-\eta, -\psi_i) \qquad (14)$$

$$\underset{\sim}{R}(\xi,0) = \begin{bmatrix} \cos\xi & \sin\xi & 0 \\ -\sin\xi & \cos\xi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \qquad (15)$$

$$\underset{\sim}{R}(\Theta^\alpha, \pi - \varphi_i) = \begin{bmatrix} \cos\Theta^\alpha & \sin\Theta^\alpha & 0 \\ \sin\Theta^\alpha \cdot \cos\varphi_i & -\cos\Theta^\alpha \cdot \cos\varphi_i & \sin\varphi_i \\ \sin\Theta^\alpha \cdot \sin\varphi_i & -\cos\Theta^\alpha \cdot \sin\varphi_i & -\cos\varphi_i \end{bmatrix} \qquad (16)$$

$$\underset{\sim}{R}(-\eta,-\psi_i) = \begin{bmatrix} \cos\eta & -\sin\eta & 0 \\ \sin\eta.\cos\psi_i & \cos\eta.\cos\psi_i & -\sin\psi_i \\ \sin\eta\text{-}\sin\psi_i & \cos\eta.\sin\psi_i & \cos\psi_i \end{bmatrix} \qquad (17)$$

$$\underset{\sim}{T}_3 = \underset{\sim}{T}'(\theta_3, \chi_1) \cdot \underset{\sim}{R}(-\eta,-\psi_i) \qquad (18)$$

$$\underset{\sim}{T}_4 = \underset{\sim}{R}(\xi,0) \cdot \underset{\sim}{T}'(\theta_4', \varphi_i) \qquad (19)$$

$$\underset{\sim}{TN} = \begin{bmatrix} \cos\varepsilon \\ \sin\varepsilon \\ 0 \end{bmatrix} \qquad (20)$$

$$\underset{\sim}{TL} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad (21)$$

Die Größen $\bar{m}_A.\bar{r}$ und $\bar{m}_D.\bar{r}$, die dem Cosinus der Winkel zwischen dem Übergangsmoment des Akzeptors bzw. des Donors und dem Fadenendenabstand $\bar{r}$ entsprechen, werden auf gleiche Weise berechnet; der Vektor $\bar{r}$ ist gegeben durch:

$$\bar{r} = A_1.A_i^{(n-2)}.A_K \qquad (22)$$

wobei $A_i = \begin{bmatrix} \underset{\sim}{T} & \underset{\sim}{1} \\ \underset{\sim}{0} & 1 \end{bmatrix}_i$

Die statistisch-mechanischen Durchschnittsgrößen werden durch Monte-Carlo-Methoden (20 000 Ketten) generiert. Die statistischen Gewichte für die einzelnen Konformationen (φ/ψ - Paare) werden durch Konformationsenergieberechnungen ermittelt (erstellen eines Konformationsenergiediagramms). Dabei wird ein 30° Netz über die Energieoberfläche des

φ/ψ-Diagramms gelegt, wobei Konformationen, deren Energie über 4 kcal/Mol über der des Minimums liegen, ausgeschlossen werden. Auf diese Weise ergeben sich 35 φ/ψ-Diederwinkelpaare.

Zur Berechnung der Konformationsenergien werden semiempirische Potentialfunktionen (8, 10, 201) der Form

$$E(\varphi/\psi) = \underbrace{(V_\varphi/2)(1-\cos 3\varphi) + (V_\psi/2)(1-\cos 3\psi)}_{\text{I}} + \underbrace{\sum_{i,j} \left(a_{ij}/r_{ij}^{12} - b_{ij}/r_{ij}^{6}\right)}_{\text{II}} + \underbrace{E_c}_{\text{III}} \qquad (23)$$

verwendet, wobei Term I dem Rotationspotentialterm um die C^α-C' (ψ)- bzw. C^α-N(φ)-Bindung entspricht. Term II entspricht der Van der Waals Wechselwirkung zwischen nichtgebundenen Atomen innerhalb der Peptideinheit und wird durch das Lennard-Jones-Potential beschrieben. Der Parameter a_{ij} des Abstoßungsterms wird so gewählt, daß die Energie des Van der Waals Terms bei der Kontaktdistanz r_{min} ein Minimum besitzt. Es gilt

$$a_{ij} = b_{ij} \cdot r_{min}/2 \qquad (24)$$

$$r_{min} = r_i + r_j + 0.2$$

Der London Parameter b_{ij} wird mit der Slater-Kirkwood Gleichung (202) nach

$$b_{ij} = (360\alpha_i\alpha_j)\Big/\left[(\alpha_i/N_i)^{1/2} + (\alpha_j/N_j)^{1/2}\right] \qquad (25)$$

berechnet. Die verwendeten atomaren Polarisierbarkeiten α_i, sowie die effektive Zahl der Elektronen N_i sind in Tab. 15 aufgeführt.

E_c steht für die Coulomb Wechselwirkung zwischen geladenen Atomen:

$$E_c = 332\, \delta_i\, \delta_j / \varepsilon\, r_{ij}^2$$

Die verwendeten Werte für die Partialladungen δ_i und Van der Waals Radien r_i sind ebenfalls in Tab. 15 angegeben.

	C^α	C'	O	H	N	CH_3	H^α
α_i [Å^3]	0.93	1.30	0.84	0.42	1.15	1.77	0.42
N_i	5	5	7	0.9	6	7	0.9
r_i [Å]	1.70	1.70	1.50	1.20	1.55	1.85	1.20
δ_i [e]	0.0	+0.394	-0.394	+0.281	-0.281	0.0	0.0

Tab. 15: Parameter für die van der Waals und Coulomb Wechselwirkung nach Brant, Miller und Flory (203, 204)

Folgende Größen wurden berechnet:

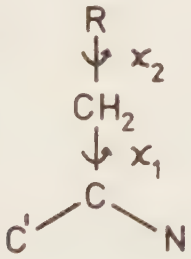
Der Persistenzvektor a, sowie $\langle r \rangle$, $\langle r^2 \rangle$, $\langle \mathscr{R}^2 \rangle$, $\langle \mathscr{R}^2 / r^6 \rangle$ und $\langle \mathscr{R}^2 \rangle / \langle r^6 \rangle$. Bei der Monte-Carlo-Generierung dieser konformationsabhängigen Größen werden Ketten mit $r < 5$ Å ausgeschlossen.

2.2. Ergebnisse und Diskussion

Die Berechnung von $\langle \varkappa^2 \rangle$ erfolgt für Modellpeptide des Typs Trp-$(Ala)_n$-Tyr als Funktion der Kettenlänge (n = 1-50), wobei Einflüsse der Flexibilität des Kettengerüsts ("random coil", völlig ungehinderte Rotation um die Einfachbindung, α-Helix, Prolin II-Typ[10]), der Seitengruppenbehandlung (Tyr und Trp), der Orientierung der Übergangsmomente sowie die Distanzabhängigkeit von $\langle \varkappa^2 \rangle$ systematisch untersucht werden.

a) Variation der Seitengruppenbehandlung von Tyr und Trp

Zunächst wird freie Rotation um die Winkel χ_1, bzw. χ_2 der Seitengruppen angenommen (Tab. 16; Kurven 1,2 in Abb. 31).



Dann werden die realen Verhältnisse durch Ermittlung der statistischen Gewichte für die bevorzugten rotationsisomeren Zustände (RIS) mit einbezogen (Abb. 31, Kurve 3; Tab. 16). Schließlich wird in Kurve 4 in Abb. 31 das Übergangsmoment von Tyrosin um 90° gedreht, um einen möglichen Einfluß auf $\langle \varkappa^2 \rangle$ zu ermitteln (die übrigen Annahmen in Kurve 4 entsprechen denen von Kurve 1).

Kurve	χ_1 [°] RIS	χ_2 [°]	stat. Gew.
1	0 /± 120	± 90	1 (alle gleich)
2	0 /± 120	0 /±90/180	1 (alle gleich
3, Tyr	- 180	- 100	0.4
	- 180	80	0.394
	- 62.2	- 70	0.104
	- 62.2	110	0.104
3, Trp	- 180	- 100	0.30
	- 180	80	0.427
	- 62.2	- 77.8	0.127
	- 62.2	102.2	0.109
	70	- 90	0.028
	60	80	0.007

Tab. 16: Seitengruppenrotationswinkel und statistische Gewichte der berechneten Peptide (siehe dazu Abb. 31)

Die Ergebnisse sind in Abb. 31 wiedergegeben und lassen sich wie folgt zusammenfassen:

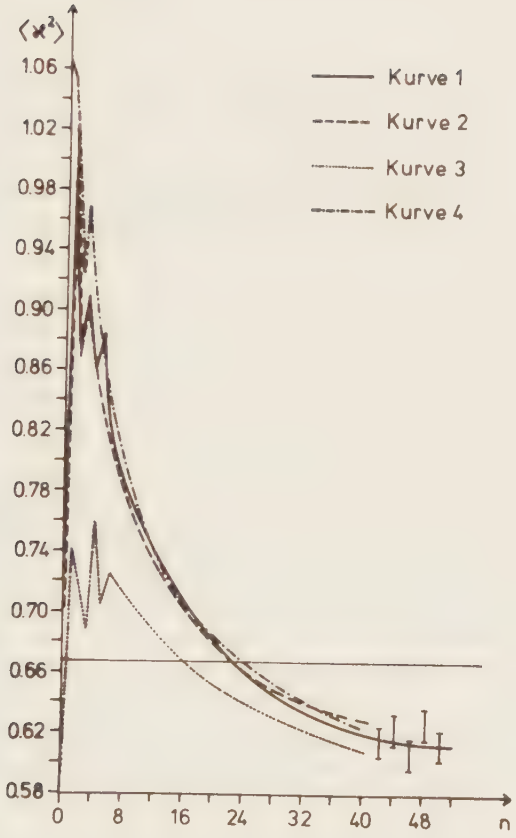


Abb. 31: $\langle \alpha^2 \rangle$ als Funktion der Kettenlänge n für Tyr-$(Ala)_n$-Trp mit der in Tab. 16 angegebenen Seitengruppenbehandlung.

1. $\langle \varkappa^2 \rangle$ erreicht selbst bei Kettenlängen bis zu 50 Alaninresten den Wert von 2/3 (Zufallsorientierung der Übergangsmomente) nicht:

n	5	10	20	30	40	50	
$\Delta\langle \varkappa^2 \rangle$	32	15	1.5	- 4	- 7	- 8	[%]

So beträgt der Fehler in $\langle \varkappa^2 \rangle$ bei einer Kettenlänge von 10 Alaninresten 15 %, bei einer Kettenlänge von 50 Alaresten - 8 %.

2. Kurve 1 und Kurve 2 in Abb. 31 unterscheiden sich nicht grundsätzlich: die Einführung zwei weiterer, gleich wahrscheinlicher rotationsisomerer Zustände (Kurve 2) für die C^{β}-C^{γ}-Seitenkettenbindungen von Tyrosin und Tryptophan hat keinen Einfluß auf die Größe von $\langle \varkappa^2 \rangle$.

3. Konformationsenergierechnungen zeigen jedoch, daß die Behandlung der Seitenkettenbindungen als frei rotierbare Bindungen unrealistisch ist: die statistischen Gewichte für die verschiedenen rotationsisomeren Zustände sind sehr unterschiedlich. Die Folge hiervon ist eine stärkere Korrelation der Chromophoren, die sich bei langen Ketten in einem größeren Abweichen von $\langle \varkappa^2 \rangle$ vom Wert der Zufallsorientierung ausdrückt (Kurve 3; Abb. 31). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Wechselwirkungen der Chromophoren mit dem Kettengerüst bei der Berechnung von $\langle \varkappa^2 \rangle$ miteinbezogen werden müssen.

4. Für Ketten mit mehr als 8 Alaninresten ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven 1 und 4, d.h. die Richtung des Übergangsmoments von Tyrosin hat keinen signifikanten Einfluß auf $\langle \varkappa^2 \rangle$ (die Richtung des Übergangsmoments von Tryptophan wurde nicht geändert).

b) Annahme einer vollkommen flexiblen Kette

Hier wurde die physikalisch unrealistische Annahme gemacht, daß die N-C^{α}- bzw. C^{α}-C'-Bindung frei rotierbar ist (keine bevorzugte Konformation); dies wurde durch 3 rotationsisomere Zustände (0°, ± 120°) mit gleichem statistischem Gewicht verwirklicht. Die Seitengruppen und Übergangsmomente wurden wie bei Kurve 1 in Abb. 31 behandelt. Abb. 32 zeigt, daß $\langle \varkappa^2 \rangle$ bei n = 34 innerhalb der gegebenen Fehlergrenze ($2\sigma_m$) den "random"-Wert von 2/3 erreicht.

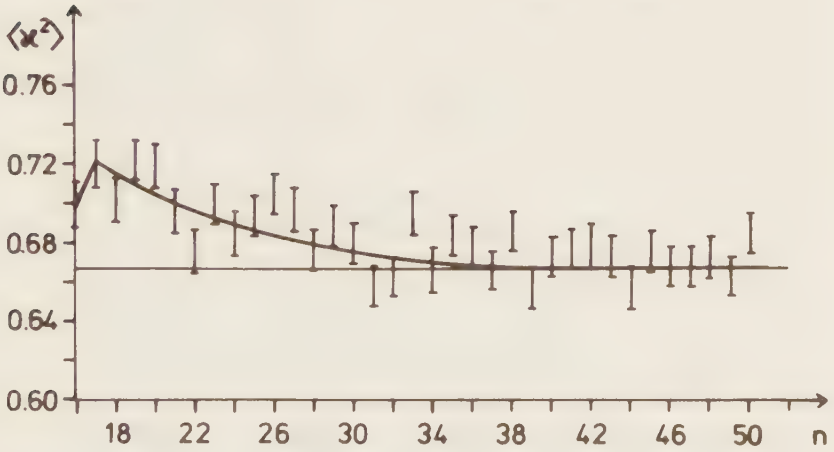


Abb. 32: $\langle \varkappa^2 \rangle$ als Funktion der Kettenlänge n für Tyr-$(Ala)_n$-Trp und der Annahme frei rotierender φ- und ψ-Diederwinkel.

Die Abweichungen von diesem Wert für kürzere Kettenlängen sind erheblich kleiner als bei der realistischen Behandlung der Peptidkette (Abb. 31), wobei die $\langle \varkappa^2 \rangle$ -Werte wiederum nach oben abweichen.

c) α-Helix

Zur Berechnung der α-Helix-Konformation wurden für φ und ψ die Werte für die rechtsdrehende "Standard"-α-Helix ($\varphi = 122°$, $\psi = 133°$) eingesetzt. In diesem Falle wurden wegen der erheblich reduzierten Orientierungsmöglichkeiten der Chromophore (4 rotierbare Bindungen) nur 8 000 Ketten generiert. Die Seitengruppen wurden "realistisch", d.h. unter Berücksichtigung der unterschiedlichen statistischen Gewichte für die rotationsisomeren Zustände behandelt (vgl. Kurve 3, Tab. 16). Die Werte von $\langle \varkappa^2 \rangle$ für verschiedene Kettenlängen sind in Kurve 1, Abb. 33 graphisch dargestellt.

$\langle \varkappa^2 \rangle$ weicht in diesem Falle im gesamten untersuchten Bereich (1-40 Aminosäurereste) vom Wert der Zufallsorientierung (2/3) ab; die Abweichungen schwanken zwischen -9 und + 37 %, wobei das Vorzeichen mit der Kettenlänge alterniert. Auffallend ist die starke Abweichung nach kleineren $\langle \varkappa^2 \rangle$-Werten, was zu relativ großen Fehlern bei der Berechnung von r führt (vgl. Tab. 17).

Ähnliche Beobachtungen werden im Falle einer Poly-Prolin-II-artigen Struktur der Peptidkette gemacht (Kurve 2 in Abb. 33); hier treten Abweichungen von $\langle \varkappa^2 \rangle$ von 24 - 94 % auf, wobei die Werte für die verschiedenen Kettenlängen erneut alternierend schwanken.

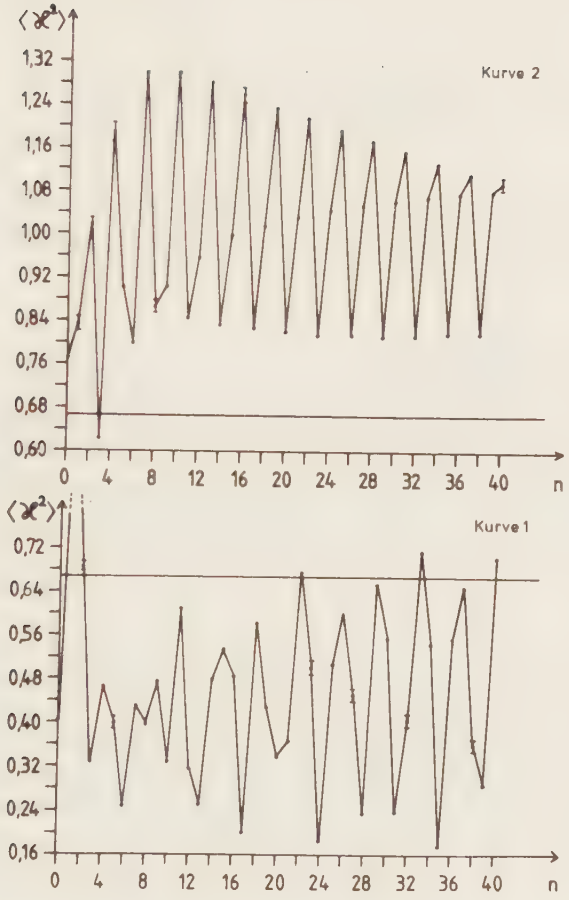


Abb. 33: $\langle \partial\varepsilon^2 \rangle$ als Funktion der Kettenlänge n für Tyr-$(Ala)_n$-Trp unter Annahme einer α-helikalen Struktur (Kurve 1) bzw. einer Prolin-II-artigen Helix (Kurve 2)

d) Untersuchung der Distanzabhängigkeit von $\langle \varkappa^2 \rangle$

Für den Fall, daß $\langle \varkappa^2 \rangle$ nicht distanzabhängig ist, muß gelten:

$$\left\langle \frac{\varkappa^2}{r^6} \right\rangle = \langle \varkappa^2 \rangle \langle r^{-6} \rangle \qquad (24)$$

Berechnungen haben ergeben, daß die Standardabweichungen der hier angewandten Monte-Carlo-Methode zur Erzeugung von

$$\frac{\langle \varkappa^2/R^6 \rangle}{\langle \varkappa^2 \rangle \langle r^{-6} \rangle}$$

zu groß sind, um zuverlässige Aussagen machen zu können; selbst dann, wenn Ketten mit $r < 10$ Å ausgeschlossen werden. Um dennoch einige Information über die Distanzabhängigkeit von $\langle \varkappa^2 \rangle$ zu erhalten, wurden die generierten Ketten entsprechend ihrem Fadenendenabstand in verschiedene Klassen (bins) eingeteilt und $\langle \varkappa^2 \rangle$ für jede dieser Klassen ermittelt (Abb. 34).

Aus dem Kurvenverlauf von $\langle \varkappa^2 \rangle$ für die verschiedenen Kettenlängen geht hervor, daß keine stark ausgeprägten Distanzkorrelationen auftreten. Lediglich bei langgestreckten Ketten tritt - wie aufgrund der bisherigen Ergebnisse zu erwarten war - eine signifikante Abweichung ein; allerdings haben diese Ketten wenig Einfluß auf den Energietransfer. Ketten mit weniger als 10 Aminosäureresten können erhebliche Distanzabhängigkeiten ihrer $\langle \varkappa^2 \rangle$ -Werte aufweisen.

2.3. Der Einfluß von $\langle \varkappa^2 \rangle$ auf Distanzbestimmungen

Nachdem die hier durchgeführten Berechnungen gezeigt haben, daß $\langle \varkappa^2 \rangle$ erheblich vom bisher ausschließlich bei Distanzbestimmungen mittels Fluoreszenzemissionsspektroskopie

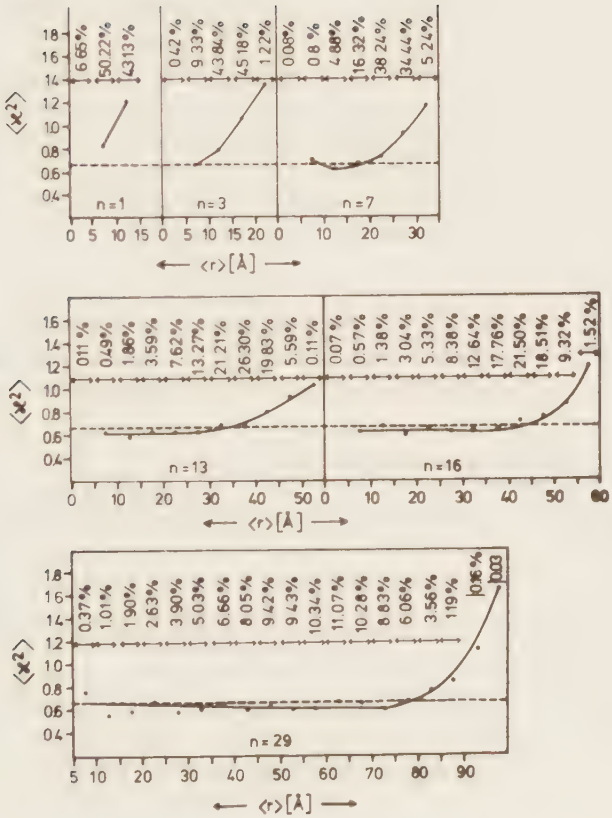


Abb. 34: Verteilungsfunktion von $\langle \partial \mathcal{R}^2 \rangle$ als Funktion der Alaninreste n bzw. des Fadenendenabstandes r.

verwendeten Zufallsorientierungswert von 2/3 abweichen kann, war zu prüfen, wie stark sich diese Abweichungen bei der Berechnung von r, dem Abstand zwischen den Chromophoren auswirken. Dies wurde am Beispiel einer ACTH-Sequenz berechnet, für die experimentelle Untersuchungen vorliegen: J. Eisinger (178) bestimmte an einem ACTH-Analogen unter der Annahme von $\langle \varkappa^2 \rangle$ = 2/3 die Distanz zwischen Tyr^2 und Trp^9; er erhielt dabei eine "transfer efficiency" E von 0.5 ± 0.15 und R_o von 9.8 Å; daraus ergibt sich ein Abstand zwischen Tyr^2 und Trp^9 von r = 9.8 Å. (R_o = Försterdistanz = Abstand der Chromophoren, bei dem der Energietransfer zu 50% erfolgt).

Um eine Vorstellung über den Einfluß verschiedener $\langle \varkappa^2 \rangle$ - Werte auf r zu erhalten, wurden basierend auf Eisingers Daten und verschiedenen Werten für $\langle \varkappa^2 \rangle$ einige Distanzen und ihr Abweichen vom Durchschnittswert (in %) in Tab. 17 zusammengestellt.

Es gelten folgende Beziehungen:

$$E = \frac{R_o^6}{R_o^6 + r^6}$$

E = Wirkungsgrad (efficiency) des Energietransfers

$R_o^6 = f(\varkappa^2)$

r = Distanz zwischen den Chromophoren

$$r = (e^{-1}-1)^{1/6} R_o \quad \text{mit } e = 0.5 \text{ und } R_o = \sqrt[6]{K.\varkappa^2}$$

wobei

$$K = (9.8)^6 / 2/3 = 1.329.10^6$$

$\langle \varkappa^2 \rangle$	$\langle \varkappa^2 \rangle$ [%]	r [%]
2.67	300	26
2.00	200	20
1.33	100	12.3
1.00	50	7
0.79	20	3.1
0.73	10	1.6
0.60	- 10	- 1.73
0.50	- 25	- 4.7
0.33	- 50	- 11
0.167	- 75	- 20
0.10	- 85	- 27

Tab. 17: Abhängigkeit der Distanz r von $\langle \varkappa^2 \rangle$

Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Ungenauigkeit begründet, mit der die Quantenausbeuten des Energietransfers bestimmt werden können; sie führt zu Fehlern von bis zu 30 % in der Transferrate (178, 197), was Fehler von bis zu 11 % in r verursacht.

Ebenso kann der unsichere Wert für die Quantenausbeute des Donors zu großen Fehlern von R_o und folglich von r (bis zu 19 %) führen (205).

2.4. Schlußfolgerung

Die Ergebnisse zeigen, daß die Distanzbestimmung von Chromophoren durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie mit einigen Unsicherheiten behaftet ist. Insbesondere der hier untersuchte Orientierungsfaktor $\langle \varkappa^2 \rangle$ hat sich als problematische Größe bei der Auswertung der Messergebnisse erwiesen. Die

Unsicherheit dieser Größe ist vor allem bei der Untersuchung von relativ starren Molekülketten und bei kleinen Molekülen groß. Hier können die Abweichungen von $\langle \varkappa^2 \rangle$ vom Wert für die Zufallsorientierung der Chromophorengruppen zu Fehlern in der Distanzmessung bis zu 30 % betragen. In diesen Fällen treten selbst dann Korrelationen auf, wenn die chromophorentragenden Seitengruppen als flexible Ketten behandelt werden.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeine Verfahren

1.1. Geräte und Materialien

Folgende Geräte und Instrumente werden bei den Arbeiten eingesetzt:

Präzisionspotentiometer E 353 und Dosimat von Metrohm AG, Herisau, Schweiz und Glaselektrode Metrohm

Autotitrator TTT1 von Radiometer, Copenhagen

Fraktionssammler mit opt. Einheit UA 5 Jasco

Dünnschichtelektrophoreseapparatur nach Camag

UV-Lampe von Camag

Schmelzpunktsbestimmungsapparat Monoskop IV nach Dr. Tottoli, Büchi

Aminosäureanalysator, Beckman Unichrom*

Spektralphotometer, Zeiss PMQ II

Selbstregistrierendes Spektrophotometer, Zeiss RPQ M4 Q III

Spektrophotometer, Zeiss PMQ II mit Camag Z Scanner

IR-Spektrograph, Perkin-Elmer Infracord

CD-Sepktrograph , JASCO, J-20

Sepktro-Polarimeter J-40

CD-Spektrograph , Jouan Roussel , Dichrograph II

NMR-Spektrometer HFX 90, Fa. Bruker

Gaschromatograph Carlo Erba, Fractovap 2101

Computer IBM 360 (Stanford), Telefunken TR 440 (Tübingen)

---

* Ich danke Herrn H.Bartholomä und Fräulein S.Naumann für die Durchführung der Analysen.

Die verwendeten Aminosäuren wurden von Merck, Darmstadt, geliefert. Fluram stammte von Hoffmann-La Roche, PEG wurde von Roth, den Chemischen Werken Hüls und Hoechst geliefert.

1.2. Reinigung von Lösungsmitteln

Die für die Peptidsynthesen verwendeten Lösungsmittel wurden wie folgt gereinigt und absolutiert:

Methylenchlorid wird über P_4O_{10} getrocknet, destilliert und über K_2CO_3 aufbewahrt.
Essigsäure wird bei Normaldruck über P_4O_{10} destilliert.
Äthanol wird mit Na absolutiert, mit Phtalsäurediäthylester unter Rückfluß gekocht und destilliert.
Methanol wird mit CaO vorgetrocknet, mit Mg absolutiert und destilliert.
Diäthyläther wird mit $CaCl_2$ vorgetrocknet, mit Na(Dispersion in Paraffin) absolutiert (Indikator Benzophenon) und destilliert.
DMF wird azeotrop nach Wasser/Benzolzusatz (2 l DMF, 100 ml H_2O, 400 ml Benzol) über eine 1m-Vigreuxkolonne destilliert, bis der Siedepunkt (152°C) erreicht wird. Dann wird unter vermindertem Druck über die Kolonne so destilliert, daß der Siedepunkt zwischen 40 und 50°C liegen (Lichtausschluß).
Triäthylamin wird durch Rückflußkochen mit Naphtylisocyanat und anschließende Destillation von primären und sekundären Aminen befreit.
N-Methylmorpholin (Merck) wird durch fraktionierte Destillation gereinigt.
DCC wird im Hochvakuum destilliert und als 2 M-Lösung in CH_2Cl_2 bei den Synthesen eingesetzt.

1.3. Synthese von BOC-Aminosäuren (206)

0.1 Mol einer Aminosäure werden in 25 - 100 ml Dioxan/Wasser (1:1) gelöst. Der vorgewählte pH-Wert (zwischen pH 9-11) wird mit 4 N NaOH mit dem pH-Stat automatisch eingeregelt. Unter kräftigem Rühren werden 15 ml (0.11 Mol) tert.-Butyloxycarbonylazid, das nach Carpino (207) dargestellt wird, zugesetzt. Nach Beendigung des Alakliverbrauchs (etwa 6-12 h) wird die Lösung mit Äther ausgeschüttelt und der Ätherextrakt verworfen. Die wässrige Lösung wird mit gleichem Volumen Essigester überschichtet und unter starkem Rühren und pH-Kontrolle mit verdünnter HCl (oder Citronensäure) auf pH 3 gebracht. Die angesäuerte Lösung wird ingesamt 3 Mal mit Essigester ausgeschüttelt, die Extrakte vereinigt und sooft mit jeweils 20 ml NaCl-gesättigtem H_2O gewaschen (ca. 5 Mal) bis der Ninhydrintest in Lösung negativ ausfällt. Anschließend wird über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die BOC-Aminosäuren lassen sich im allgemeinen aus wenig Essigester unter Petrolätherzusatz kristallisieren. Die Ausbeuten liegen zwischen 60 und 90 % (siehe Tabelle).

BOC-As	pH	Reaktionszeit (h)	Ausb. (%)	Fp. (Lit.)
BOC-Gly	10.0	8	80	89- 91° (94- 95°)
BOC-Ala	11.0	8	79	79- 80° (80- 82°)
BOC-Val	9.8	8	66	72- 73° (72- 73°)
BOC-Pro	9.1	10	75	133-134° (136-137°)
BOC-Trp	10.4	10	68	132-134° (135-137°)
BOC-Phe	10.4 (30°C)	10	83	81- 83° (84- 86°)
BOC-Met	9.8	6	88	133-135° (138-139°)

1.4. Synthese trifunktioneller Aminosäurederivate

a) Di-BOC-His(MG 355) über das DCH-Salz (208)

13.2 g Histidin, freie Base (≙ 85 mMol), werden in 500 ml DMSO suspendiert, 60 ml Triäthylamin (≙ 4.28 mMol) und 60 ml BOC-Azid (= 428 mMol) zugegeben. Die Mischung wird 48 h bei RT bis zum Klarwerden gerührt. Die nun folgende Aufarbeitung wird bei 4°C ausgeführt. Nach Zugabe von 1.8 l H_2O wird die Lösung mit 2 x 400 ml Äther gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 2 N HCl unter Kühlung auf einen pH von 2.5 eingestellt und anschließend 2 Mal mit 400 ml Essigester extrahiert. Die organische Phase wird 2 Mal mit 300 ml H_2O und 3 Mal mit 100 ml NaCl-gesättigter wässriger Lösung gewaschen. Die Essigesterlösung wird dann über $MgSO_4$ bei RT getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen; es fallen 16 g Öl an (80% d.Lit; 53% d.Th.): Zur Überführung ins DCH-Salz wird das Öl in 120 ml $CHCl_3$ gelöst, auf 0° gekühlt, mit 24 ml Dicyclohexylamin versetzt, bei 0° mit 600 ml Petroläther verdünnt und bei 4° auskristallisiert.
Ausbeute: 20.4 g (68% d.Lit.; 46% d.Th.). Fp.: 154-156°; Lit.: 155-157°.
Zur Freisetzung von Di-BOC-His aus dem DCH-Salz werden 5.36 g Salz (= 10 mMol) in der Kälte mit 100 ml Essigester versetzt und unter Rühren tropfenweise 14 ml H_2O und 11 ml 1 N H_2SO_4 dazugegeben. Nach Abtrennen der wässrigen Phase wird die organische Phase 4 Mal mit 20 ml H_2O gewaschen. Anschließend wird bei RT über $MgSO_4$ getrocknet und der Essigester am Roationsverdampfer abgezogen. Ausbeute: 3.16 hochviskoses Öl (94% d.Lit.; 89% d.Th.). r_f = 0.62 in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1).

b) BOC-L-Glu-γ-benzylester (MG 337) (209)

Zu 500 ml Äther werden 50 ml 98% H_2SO_4 und 500 ml Benzylalkohol zugefügt. Nach Abziehen des Äthers im Vakuum werden

73.5 g (0.5 Mol) L-Glutaminsäure in kleinen Portionen dazugelöst; die Lösung wird anschließend 20 h bei 20° gehalten. Danach werden 1000 ml 96% EtOH und unter starkem Rühren 250 ml Pyridin zugegeben. Die Kristallisation setzt augenblicklich ein. Nach 10 h bei 0° wird abfiltriert, mit trockenem Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 80.8 g (82% d.Lit.). Nach Umkristallisieren aus 950 ml kochendem H_2O, das 10 ml Pyridin enthält und 6 h Stehen bei 0° erhält man 72 g (80% d.Lit.; 61% d.Th.) L-Glu-γ-benzylester. Fp. 184-186° (Lit.: 189° (209), 169-170° (210), 174° (211)). Die Umsetzung zum BOC-Derivat erfolgt wie unter 1.3. beschrieben: pH = 9.1, Reaktionszeit: 24 h (30°), Ausbeute: 38%. Das Produkt fällt als Öl an und wird durch DC auf Einheitlichkeit geprüft.

c) BOC-(O-Benzyl)-tyrosin (MG 381) (213)

72.4 g L-Tyrosin (0.4 Mol) werden in ca. 300 ml 2 N-NaOH in der Hitze gelöst, 49.9 g $CuSO_4.5H_2O$ (0.2 Mol), in 200 ml H_2O gelöst, dazugegeben und 20 Min. im heißen Wasserbad stehen gelassen. Der nach dem Abkühlen ausgefallene Kupferkomplex wird durch Zugabe von ca. 1500 ml MeOH und weiteren 100 ml 2 N-NaOH fast vollständig in Lösung gebracht. Anschließend werden 50 ml Benzylbromid (0.42 Mol) auf einmal hinzugefügt und das Gemisch bei 25° während 1 h stark gerührt. Der ausgefallene Kupferkomplex wird abgesaugt, mit MeOH/H_2O 1:3,5 nachgewaschen und bei 60° getrocknet. Ausbeute: 84.4 g (98% d.Lit.; 70% d.Th.)
Komplexzerstörung (212): 83 g Cu-Komplex werden in 3 L 0.1N HCl suspendiert, mit 120 g EDTA, gelöst in 400 ml heißem H_2O, versetzt und während 3 h bei 30° gerührt. Dann wird mit konz. NaOH ein pH von 6.5 eingestellt und in den Kühlschrank gestellt. Nach 12 h wird abgenutscht, mit H_2O, Aceton, Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute an O-Benzyltyrosin: 56 g (74% d.Th.). Umkristallisiert wird aus 80% Eisessig (125 ml/10g). Ausbeute: 34 g (62% d.Lit.; 46% d.Th.). Fp.: 234-236 (Lit.: 223°, 235°).

Die Umsetzung zum BOC-Derivat erfolgt wie unter 1.3. beschrieben: pH = 10.3, Reaktionszeit: 22 h (26-34°), Ausbeute: 39% d.Th., Fp.: 104-106° (Lit. 108-110°).

d) BOC-(ε-Z)-Lysin (MG 380) (214)

55 g Lys.HCl (0.3 Mol) werden in 600 ml H_2O gelöst und in der Hitze mit 60 g $CuCO_3$ versetzt. Das überschüssige $CuCO_3$ wird abfiltriert und die klare, blaue Lösung unter Eiskühlung und kräftigem Rühren mit 110 g CbO-Chlorid versetzt. Der pH 9.2 wird am pH-Stat mit 4N NaOH automatisch eingeregelt. Nach 12 h Reaktionszeit bei 0° wird abfiltriert, mit H_2O, EtOH und Äther gewaschen. Ausbeute an Lys-Kupferkomplex: 78 g (84% d.Th.).
Komplexzerstörung (212): 78 g Cu-Komplex werden in 2l H_2O suspendiert, unter starkem Rühren mit 620 ml rauch. HCl versetzt (grüne Lösung) und 1 h gerührt. Danach werden 100 g EDTA, gelöst in 300 ml sied. H_2O, dazugegeben und mit konz. NaOH unter starkem Rühren auf pH 6.5 gebracht. Nach 48 h Stehen bei 4° wird abgenutscht, mit wenig kaltem H_2O nachgewaschen und aus 10 L H_2O umkristallisiert. Ausbeute an ε-Cbo-Lys: 55 g (80-110% d.Lit., 84% d.Th.), Fp: 250 - 252° (Lit.: 255°).
Die Umsetzung zum BOC-Derivat erfolgt wie unter 1.3. beschrieben: pH = 10.2, Reaktionszeit: 12 h (26-31°), Ausbeute: 96% d.Th.

e) BOC-Arg.HCl.H_2O (MG 329) (215)

51 g Arg, freie Base (0.29 Mol), werden in 70 ml Dioxan-H_2O 1:1 supendiert, bei 50-52° mit 32 ml BOC-Azid versetzt und ein pH von 9.9 automatisch am pH-Stat mit 4 N NaOH eingeregelt. Nach 3 h bei ca. 50° und starkem Rühren wird die Lösung klar. Das Dioxan wird im Vakuum abgezogen, 40 ml H_2O zugefügt und 2 Mal mit Äther ausgeschüttelt. Nach Abkühlen auf 0° wird die wässrige Lösung mit 3N HCl auf pH 3 gebracht.

Nach kurzem Stehen bei 0° wird abfiltriert. Ausbeute: 39 g (41% d.Th.). Nach Umfällung aus 500 ml H_2O/250 ml 3 N HCl werden 19 g (49% d.Th.; 74% d.Lit.) erhalten. Fp.: 116° (Lit. 117-119°).

d) Tri-Z-Arg (MG 573) (216)

Tri-Z-Arg wird aus Arg.HCl und Cbo-chlorid über das Tri-Z-Arg-Natriumsalz hergestellt.*
Fp.: 138-139°.

1.5. Produktcharakterisierung

a) Dünnschichtchromatographie:

Für die DC werden durchweg DC-Fertigplatten Kiesel 60 mit und ohne Fluoreszenzindikator F 254 (Fa. Merck) benutzt. Als Laufmittel dienen:

Butanol/AcOH/H_2O (4:1:1)und (3:1:1)
Dioxan/H_2O (3:1)
EtOH/Benzol/AcOH/H_2O (40:10:5:20)
Äthylenglykol/Lutidin (19:1) und (4:1)
Benzol/Pyridin(AcOH (20:8:1)

Zur Entwicklung der DC-Platten werden folgende Methoden angewandt:

UV-Licht, 254 nm, 366 nm
Ninhydrin Sprühreagenz (217)
Chlor-Tolidin-Reagenz (217)
Sakaguchi Reagenz (218)
Dragendorff-Bürger-Reagenz (219)
Fluram (220)

---

* Ich danke Herrn Dr. W. Stein für die Überlassung des Präparats.

b) Aminosäureanalysen

saure Hydrolyse:

Eine eingewogene Menge PEG-Peptid wird in einer Ampulle mit 2 ml 6 N HCl versetzt, im Trockeneisbad bzw. in flüssigem N_2 eingefroren und unter Hochvakuum abgeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgt während 24 h bei 110°. Vor Abziehen des Lösungsmittels wird ein interner Standard (peptidfremde Aminosäure) zugesetzt, um Verluste beim Abdestillieren und Auftragen zu korrigieren. Es empfiehlt sich bei Beladungsbestimmungen den Rückstand mit einer Pufferlösung aufzunehmen, die einen internen Standard (z.B. Norleu) enthält, um ev. Apparatefehler auszuschalten.

basische Hydrolyse:

Bei Trp-haltigen Peptiden wird basisch hydrolysiert. Eine eingewogene Menge PEG-Peptid wird im zugeschmoleznen Hydrolyserohr mit 1 ml H_2O und 65 mg $Ba(OH)_2.8H_2O$ während 24 h bei 125-130° erhitzt. Das erhaltene Reaktionsgemisch wird mit 2 N H_2SO_4 auf pH 6 gestellt, aufgekocht und zentrifugiert. Die Fällung wird nachgewaschen und die Überstände wie oben weiterverarbeitet.

c) Gaschromatographie

Racemisierungstest für Aminosäuren (226)*

Die unpolaren Aminosäuren werden als Pentafluor-propionyl-aminosäure-isopropylester (PFP/IP) über eine Kapillarsäule mit einem Val-Val-Derivat als stationäre Phase geprüft. Die polaren Aminosäuren Glu und Tyr werden an einer mit einem Phe-Asp-Derivat belegten Säule untersucht. Der D-Anteil lag bei allen untersuchten Aminosäuren unter 2%.

---

* Herrn G. Nicholson danke ich für die Durchführung der Messungen.

2. Spezielle Methoden

2.1. Durchführung des Fluramtests zur Umsatzbestimmung

Zum Umsatztest wird eine Probe N^{α}-BOC-Peptid-PEG (z.B. 20 mg, PEG, Mol.-Gew. 10^4) in 0.5 ml CH_2Cl_2 (oder DMF) gelöst und davon 1 und 10 µl auf eine DC-Platte (Kieselgel, ohne Fluoreszenzindikator) aufgetragen. Als Standard wird der 20-ste Teil der obigen Menge vom ungekuppelten Produkt (H-Peptid-PEG) (2 mg in 1 ml CH_2Cl_2) in gleicher Weise auf die Platte aufgetragen. Zur Entwicklung wird die Platte zuerst mit Na_2CO_3-Lösung (5%-ig), dann mit Fluramlösung (10 mg/100 ml Aceton) gleichmäßig besprüht und ca. 1 Min. bei RT stehengelassen. Ein Vergleich der Fluoreszenz im UV-Licht zeigt die Kupplungsausbeute: Liegt die Fluoreszenzintensität der kleinsten Menge des ungekuppelten Ausgangsprodukts über der größten Menge des umgesetzten Produkts, so ist der Umsatz zu über 99% erfolgt. Durch die Verwendung des Camag-Z-Scanners kann die Platte quantitativ ausgewertet werden. Allerdings ergeben sich hier oft Schwierigkeiten durch asymmetrische Peakformen als Folge von unregelmäßiger Entwicklung oder ungleichmäßiger Plattenoberfläche, was die Reproduzierbarkeit herabsetzt.

2.2. Bestimmung der Hydroxylgruppenkapazität von PEG

2.2.1. Synthese der Modellurethanverbindungen

a) Synthese von N-Phenyläthylurethan (MG 165)

35 g EtOH abs. (0.75 Mol) werden mit 16 ml Phenylisocyanat (0.15 Mol) versetzt und 3 h rückflußgekocht. Das EtOH wird im Vakuum abdestilliert, worauf der Rückstand im Eisbad durchkristallisiert. Nach Reinigung mit Aktivkohle in Essigester wird das Produkt mehrmals mit kaltem Petroläther digeriert, wobei es gelingt, eine geringe Menge kristallin zu isolieren.

Fp.: 50-51° (Lit.:53°).

Analyse:						
	ber.	C	65.45	H	6.67	N 8.48
	gef.		65.47		6.60	8.28

UV-Daten: $\varepsilon_{235.5}$ = 17'600 ± 200 (MeOH); (Lit. log $\varepsilon_{235.5}$ = 4.23; EtOH)

b) Synthese von Äthylenglykolmonomethyläther-N-phenylcarbaminat (MG 195)

Peroxidfreies Methylcelloslve wird über Na_2SO_4 vorgetrocknet, über CaH_2 2 h rückflußgekocht und destilliert. 80 ml getrockneter Äthylenglykolmonomethyläther (1 Mol) werden mit 108 ml dest. Phenylisocyanat (1 Mol) und 0.5 ml Dibutylzinndilaurat als Katalysator versetzt. Nach Abklingen der heftigen Reaktion wird noch 2h bei RT stehen gelassen. Anschließend werden evtl. nicht umgesetzte Ausgangsprodukte im Hochvakuum abdestilliert. Das als Öl anfallende Produkt (189 g ≙ 97% d.Th.) wird in siedendem Petroläther gelöst, mit Aktivkohle gereinigt und ein kleiner Teil davon im Tiefkühlschrank zur Kristallisation gebracht.
Fp.:29-30°(Lit.: Öl)

Analyse:						
	ber.	C	61.54	H	6.67	N 7.18
	gef.		61.84		6.87	7.23

UV-Daten: $\varepsilon_{235.5}$ = 17'500 ± 200 (MeOH)

Zusätzlich wurde das Produkt durch IR- und NMR-Spektroskopie charakterisiert.

c) Synthese von Diäthylenglykolmonomethyläther-N-phenyl-carbaminat (MG 239)

Die Darstellung des Diäthylenglykolmonomethyläther derivats erfolgt analog nach der unter b) beschriebenen Vorschrift. Das ebenfalls als Öl anfallende Produkt konnte nicht zur Kristallisation gebracht werden.

Analyse: ber. C 60,25 H 7,11 N 5,86
gef. 60,97 7,40 6,41

UV-Daten: $\varepsilon_{235.5}$ = 17'500 ± 200 (MeOH)

Zusätzlich wurde das Produkt durch IR- und NMR-Spektroskopie charakterisiert.

2.2.2. Bestimmung der Hydroxylgruppenkapazität

PEG wird bei 110° und 0.1 Torr ca. 2 h über P_4O_{10} getrocknet. 1 g trockenes PEG, Mol.-Gew. 10^4, wird in 5 ml CH_2Cl_2 (dest.) gelöst und unter Ausschluß von Feuchtigkeit mit 0.5 ml frisch destilliertem Phenylisocyanat (4.7 mMol) und 2 - 3 Tropfen Dibutylzinndilaurat versetzt. Die klare Lösung wird 4 h bei RT stehengelassen. Dann wird die Lösung auf ca. 3 ml eingeengt und das PEG-Urethan durch tropfenweises Zugeben von Diäthyläther (ca. 30 ml) unter Rühren ausgefällt; es wird noch 10 Min. im Eisbad weitergerührt, der Niederschlag abgesaugt (G-3 Glasfritte) und mit viel Äther nachgewaschen. Es wird ein weiteres Mal aus CH_2Cl_2 (2 ml) mit Äther gefällt und anschließend getrocknet. Abschließend wird das Produkt in 20 ml MeOH (dest.) unter leichtem Erwärmen gelöst und bei 0-4° mehrere Stunden oder über Nacht stehen gelassen. Das auskristallisierte PEG-Urethan wird wie oben abgesaugt oder abzentrifugiert, mit Äther nachgewaschen und über P_4O_{10} bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anstatt durch Methanolfällung kann das PEG-Urethan über eine Sephadex-LH 20-Säule (3 x 50 cm) gereinigt werden. Als Elutionsmittel ist Methanol geeignet, die Detektion kann mit dem Dragendorff-Bürger-Reagenz (219) auf DC-Platten erfolgen. Das PEG-Urethan kristallisiert nach der Reinigung über die Säule selbst aus dem hochverdünnten Eluat bei 0° aus. Das Eluat kann auch eingeengt und das PEG-Urethan mit Äther gefällt werden. Bei routinemäßiger Durchführung der Bestimmung ist die Reinigung über die Säule (Zeitaufwand ca. 3-4 h bei einer Elutionsge-

schwindigkeit von ca. 80 ml/h) vorzuziehen, obwohl die Reinigung durch eine einmalige Methanolfällung bei sorgfältigem Arbeiten (Ausschluß von Feuchtigkeit) ausreichend ist.

Zur Bestimmung der Hydroxylgruppenkapazität wird eine genau gewogene Menge der Probe in MeOH gelöst und gegen eine PEG-Lösung gleichen Mol.-Gewichts und Konzentration im UV bei 235.5 nm gemessen. Die Konzentration C_A der OH-Gruppen pro eingewogene Probe ergibt sich aus der gemessenen Extinktion E_λ bei λ_{max} = 235.5 nm mit ε_{max} = 17500 nach $C_A = E_\lambda / \varepsilon_\lambda . d$ [Mol/l]. Daraus errechnet sich die Hydroxylgruppenkapazität, d.h. mMol OH-Gruppen/g PEG nach $\frac{C_A [mMol/l]}{Einwaage\ [g/l]}$. Das mittlere Molekulargewicht $\bar{M}_n$ bzw. die handelsübliche Hydroxylzahl (OHZ) errechnen sich folgendermaßen: $\bar{M}_n = 2\ A/C_A$ und OHZ = $56110 \cdot C_A/A$, wobei A als Einwaage in g/l, C_A als die durch Extinktionsmessung bestimmte Konzentration an OH-Gruppen in Mol/l und die OHZ als mg KOH-Verbrauch/g Polymer definiert sind.

3. Veresterung von PEG mit BOC-Gly

36 g über P_4O_{10} getrocknetes PEG, Mol.-Gew. 10^4 bzw. 2.10^4 werden in 100 ml CH_2Cl_2 gelöst, und BOC-Gly-Anhydrid (separat mit DCC hergestellt (95)) in 4-fachem Überschuß zugegegeben. Die Lösung wird mit 4 ml Pyridin als Katalysator versetzt, auf ca. 50 ml eingeengt und über Nacht bei RT stehengelassen. Nach einer Zwischenfällung (Zugabe von 500 ml Äther, einrotieren, Zugabe von 30 ml DMF) wird noch 1 h weitergekuppelt. Anschließend werden 2 ml (21 mMol) Acetanhydrid (in 5 ml CH_2Cl_2) zugesetzt und 1 h bei RT stehengelassen. Die Lösung wird eingeengt und der PEG-Ester aus CH_2Cl_2 mit Äther gefällt. Das abfiltrierte Produkt wird erst aus CH_2Cl_2 mit Äther, dann aus MeOH gefällt. Dazu wird der PEG-Ester in 600 ml MeOH (ca. 5%-ige Lösung) unter leichtem Erwärmen gelöst und über Nacht bei 0-4° auskristallisiert. Nach Abfiltrieren und Nachwaschen mit Äther wird das Produkt bis

zur Gewichtskonstanz über P_4O_{10} getrocknet. Ausbeute 35 g. Die verschiedenen Variationen der Reaktionsbedingungen zur Untersuchung des Reaktionsablaufs der Veresterung sind in Tab. 18 zusammengefaßt.

Akt.meth.	Reaktionsbedingungen					Beladung
	Konz(G/V)	Kat.	Ü.	Temp.	Rz.(h)	(%)
symm.Anh. (DCC)	10 %	Pyridin	4	25°C	1	74.9
"	"	"	"	"	2	76.1
"	"	"	"	"	21	73.9
"	"	"	6	45°C	50	75.0
"	30 %	"	4	25°C	4	75.5
"	10 %	$(Et)_3N$	4	"	4	27.4
"	"	DBZL	4	"	4	75.6
symm.Anh. (Phosgen)	"	Pyridin	"	"	21	73.0

Abkürzungen: Akt.meth. = Aktivierungsmethode
Kat. = Katalysator
Ü = Überschuß an BOC-Gly-Anhydrid
R.z. = Reaktionszeit
DBZL = Dibutylzinndilaurat

Tab. 18: Reaktionsbedingungen zur Veresterung von PEG mit BOC-Gly

4. Darstellung der Oligopeptide

4.1. Deka(L-Ala)-PEG

a) Veresterung von PEG, Mol.-Gew. 6000:

6 g über P_4O_{10} getrockentes PEG, Mol.-Gew. 6.10^3 werden in 60 ml CH_2Cl_2 gelöst. 20 mMol BOC-Ala (3.78 g) werden mit 10 mMol DCC 15 Min. bei 0° voraktiviert (95), zur PEG-Lösung gegeben und nach Zusatz von 3 Tropfen Pyridin während 24 h rückflußgekocht. Nach weiteren 24 h Stehen bei RT wird vom ausgefallenen DC-Harnstoff abfiltriert, auf ca. 20 ml eingeengt und der BOC-Ala-PEG-Ester durch Zutropfen von Äther unter starkem Rühren bei 0° ausgefällt. Der kristalline Niederschlag wird abgesaugt, mit Äther gewaschen und erneut aus wenig CH_2Cl_2 mit Äther gefällt. Ausbeute: 5.9 g; Beladung nach Aminosäureanalyse: 0.81 mMol Ala/3 g PEG.

b) Synthesezyklus:

Das Peptid wird stufenweise nach folgendem Synthesezyklus aufgebaut: Zur Abspaltung der BOC-Schutzgruppe wird das Produkt in TFA/CH_2Cl_2 (1:1) bei RT 20 Min. stehengelassen (10% G/V); dann wird die klare Lösung eingeengt, und durch Zugabe von Äther unter starkem Rühren und Kühlen das PEG-Peptid ausgefällt. Nach Absaugen, Waschen mit Äther und Trocknen wird das Produkt in wenig MeOH oder DMF aufgenommen und erneut mit Äther gefällt. Zur Kupplung wird das getrocknete Produkt in CH_2Cl_2 (10% G/V) gelöst, mit N-Methylmorpholin neutralisiert (frisch hergestellte 1 M Lösung in CH_2Cl_2) und bei 0° mit 3-fachem Überschuß an BOC-Ala-Anhydrid (separat nach der DCC-Methode dargestellt (95)) versetzt. Die Kupplungszeit wird von 60 Min. bis zu mehreren Stunden variiert. Der Umsatz wird durch Ninhydrin- und Fluramtest bestimmt.

c) Syntheseverlauf

Die Reaktion ist in den Stufen 1-7 nach ca. 30 Min. zu über 99.5% verlaufen. Zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit wird bei wachsender Kettenlänge die Kupplungslösung nach wenigen Minuten stark eingeengt. Ab Stufe 5 (Pentapeptid) nimmt die Viskosität des Oligopeptidesters in CH_2Cl_2 stark zu. Deshalb werden ab dieser Stufe der Kupplungslösung steigende Mengen an DMF zugesetzt. Ab Stufe 8 wird in DMF unter Zusatz von DMSO gekuppelt. Aus der Abnahme der Farbausbeute des Standards (1 µMol H-$(Ala)_n$-PEG) beim Ninhydrintest in Lösung kann auf die starke Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit der Aminofunktion (Solvatation, Einfluß der Konformation!) geschlossen werden. Deshalb wird ab Stufe 8 über Nacht gekuppelt. Der quantitative Umsatztest ergibt dann vollständige Reaktion.

Mit zunehmender Kettenlänge verlangsamt sich die Kristallisationsgeschwindigkeit des PEG-Peptids. Beim Fällen mit Äther aus CH_2Cl_2 oder DMF erhält man deshalb in den höheren Synthesestufen zunächst überwiegend amorphe Niederschläge; erst nach längerem, heftigen Rühren im Eisbad tritt Teilkristallisation des PEG ein, was nach 1-2 h schließlich zu gut filtrierbaren Niederschlägen führt.

Die Entfernung der niedermolekularen Komponenten ist nach zwei- bis dreimaliger Fällung mit Äther nach DC (r_f PEG-Peptid = 0) vollständig. In jeder Synthesestufe werden 50 - 100 mg BOC-$(Ala)_n$-PEG bzw. H-$(Ala)_n$-PEG für die Konformationsuntersuchungen entnommen. Da die Menge an aktiver Komponente bei der Kupplungsreaktion beibehalten wird, erhöht sich dadurch der effektive Überschuß an BOC-Ala-Anhydrid im Verlauf der Synthese.

d) Produktanalyse

Wegen der geringen Aussagekraft der Aminosäureanalyse bei Homooligopeptiden wird an H-$(Ala)_{10}$-PEG ein Glycinrest gekuppelt. Dazu werden zunächst evtl. entstandene freie OH-Gruppen am PEG durch Umsetzung von BOC-$(Ala)_{10}$-PEG mit einem großen Überschuß an Acetanhydrid blockiert. Nach dem oben beschriebenen Verfahren wird anschließend BOC-Gly-Anhydrid an H-$(Ala)_{10}$-PEG gekuppelt. Die Aminosäureanalyse des hydrolysierten Produkts ergibt ein Verhältnis Ala:Gly = 9.7:1. Die Beladung beträgt (auf Gly bezogen): 0.75 mMol Peptid/ 3 g PEG.
Zur weiteren Charakterisierung wird eine Probe des PEG-Dekaalanins alkalisch hydrolysiert (1 N KOH, 4 h, in DMF/ H_2O) und dünnschichtchromatographisch in verschiedenen System untersucht; die Analysen deuten auf ein reines Produkt hin.
Zur Prüfung auf Racemisierung wird eine Probe hydrolysiert (6 N HCl, 110°, 24 h), mit Trifluoressigsäureanhydrid derivatisiert und durch GC auf D-Anteile untersucht (98)*. Der Anteil an D-Ala liegt unter 2%.

4.2. H-$(Val)_8$-Gly-PEG

a) Veresterung von PEG, Mol.-Gew. 2.10^4:

36 g PEG, Mol.-Gew. 2.10^4 werden nach der in Kap. V.3. angegebenen Vorschrift verestert.

---

*Herrn G. Nicholson danke ich für die Durchführung der Messungen.

Veresterungsgrad nach Aminosäureanalyse: 0.106 mMol Gly/g PEG ≙ 100% d.Th. (bezogen auf exp. bestimmte OH-Gruppenkapazität).

b) Synthesezyklus

Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe erfolgt mit TFA/CH_2Cl_2 (2:1) während 30 min. bei 25°. Nach 3-maligem Fällen mit Äther (siehe 4.1.) erhält man in allen Stufen gut filtrierbare, pulverige Produkte.

Der Synthesezyklus wird entsprechend Tabelle 19 durchgeführt.

Stufe	LM	Ü.	R.z.(h)	Zw'fäll.	Fällungen	U.(%)	Ausbeute (g)
1 ← 0	CH_2Cl_2	6	20	1/1	3xÄther	>99.5	10.0
2 ← 1	CH_2Cl_2	6	17	1/2	3xÄther	>99	9.8
3 ← 2	CH_2Cl_2	6	16	1/14	2xÄther; 1xMeOH	>99	9.5
4 ← 3	CH_2Cl_2	6	16	1/4	1xÄther; 1xMeOH	>99	9.1
5 ← 4	CH_2Cl_2/DMF (5:1)	6	17	1/1	1xÄther; 1xMeOH	>99	8.8
6 ← 5	CH_2Cl_2/DMF (5:1)	6	17	2/2,16	3xÄther	>99	8.6
7 ← 6	CH_2Cl_2/DMF (1:1)	6	18	2/2,16	3xÄther	>99	8.5
8 ← 7	DMF	6	20	2/3,16	3xÄther	>99	8.3

Abkürzungen: Ü. = Überschuß an BOC-Val-Anhydrid
R.z. = Reaktionszeit
Zw'fäll. = Zwischenfällungen (Anzahl/nach x h)
U. = Umsatz (nach Fluramtest)

Tab. 19: Kupplungsbedingungen bei der Synthese von H-$(Val)_8$-Gly-PEG

Zur Kupplung wird bei dieser Synthese die Aktivestermethode mit DCC als Aktivierungsmittel benützt (95). Dazu werden äquimolare Mengen an BOC-Val und DCC bei 0° in wenig CH_2Cl_2 gelöst und die Lösung während 20 Min. bei RT stehengelassen. Der aktive Ester wird unter Absaugen des ausgefallenen DC-Harnstoffs zur neutralisierten PEG-Peptidlösung gegeben. Die ursprünglich 10%-ige Lösung wird nach ca. 30 Min. stark eingeengt (ca. 35%). Während der Kupplung werden grundsätzlich Zwischenfällungen durchgeführt (siehe Tab. 19). Zur Reaktionslösung wird soviel Äther zugegeben bis das PEG-Peptid ausfällt. Die Kristallisation des PEG-Peptids wird durch Abziehen des Äthers am Rotationsverdampfer vervollständigt. Nach dem Abdestillieren des Äthers wird die Kupplungsreaktion durch Zufügen von CH_2Cl_2 fortgesetzt (bei Anwesenheit von DMF wird unmittelbar eine klare Lösung zurückerhalten).

Zur Fällung aus MeOH wird das PEG-Peptid bei 35° in MeOH gelöst (5%), die klare Lösung in Zentrifugenbecher übergeführt und über Nacht bei 0-4° stehengelassen. Das auskristallisierte PEG-Peptid wird anschließend abzentrifugiert. Nach Abdekantieren wird der Niederschlag mit Äther digeriert, abfiltriert, mit Äther nachgewaschen und im Vak. getrocknet.
Analytische Daten von $BOC(Val)_8$-Gly-PEG:
Aminosäureanalyse Gly:Val = 1:7.1* (theor. 1:8.0)

* Der zu tiefe Wert für Valin wird auf unvollständige Hydrolyse zurückgeführt.

Beladung nach Aminosäureanalyse: 0.082 mMol Gly/g PEG ≙ 100% d.Th.. Molare Elliptizität: Θ_m bei 218 nm = -6.1×10^4 [Grad. cm^2. $Dezimol^{-1}$] .

4.3. $H-(Ile)_8$-Gly-PEG

Ausgangsprodukte: BOC-Gly, BOC-Ile, PEG, Mol.-Gew. 2×10^4
Die Veresterung von PEG mit BOC-Gly erfolgt analog zu 4.1.a). Veresterungsgrad: 0.097 mMol Gly/g PEG ≙ 100% d.Th. (auf OH-Gruppenkapazität bezogen).

Der Synthesezyklus wird entsprechend Tab. 20 durchgeführt.

Stufe	LM	Ü.	R.z. (h)	Zw'fäll.	Fällungen	U.(%)	Ausbeute (g)
1 ← 0	CH_2Cl_2	5	5	1/3	3xÄther	>99	10.0
2 ← 1	CH_2Cl_2	6	14	1/12	3xÄther	>99	9.9
3 ← 2	CH_2Cl_2	6	16	1/4	1xÄther;1xMeOH	>99	9.4
4 ← 3	CH_2Cl_2	6	16	1/14	1xÄther;1xMeOH	>99	9.0
5 ← 4	CH_2Cl_2/DMF (3:1)	6	16	1/14	3xÄther	>99	8.8
6 ← 5	DMF	6	20	2/4,18	3xÄther	>99	8.5
7 ← 6	DMF/DMSO (1:1)	6	20	2/4,18	3xÄther	>99	8.1
8 ← 7	DMF/DMSO (1:1)	6	20	2/4,18	3xÄther	>99	7.8

Abkürzungen: Ü. = Überschuß an BOC-Ile-Anhydrid
R.z. = Reaktionszeit
Zw'fäll. = Zwischenfällungen (Anzahl/nach x h)
U. = Umsatz (nach Fluramtest)

Tab. 20: Kupplungsbedingungen bei der Synthese von H-$(Ile)_8$-Gly-PEG

Zur Kupplung wird die Anhydridmethode (95) (siehe 4.1.) verwendet. Zur Erzielung einer klaren Lösung wird ab Stufe 5 zunächst eine verdünnte Lösung des PEG-Peptids in CH_2Cl_2/DMF bzw. DMSO hergestellt und vor Zugabe der aktiven Komponente durch Abziehen des CH_2Cl_2 eingeengt. Die Lösung ist beim Beginn der Kupplungsreaktion 10%-ig und wird nach der ersten Zwischenfällung auf 20-30% eingeengt.

Analytische Daten von BOC-$(Ile)_8$-Gly-PEG:

Aminosäureanalyse Gly:Ile = 1:6.7* (theor. 1:8)

* Der zu tiefe Wert ist auf unvollständige Hydrolyse zurückzuführen. Beladung nach Aminosäureanalyse: 0.078 mMol Gly/g PEG ≙ 79% d.Th. Molare Elliptizität bei 218 nm: $-5.8.10^4$ $\left[\text{Grad. cm}^2\text{. Dezimol}^{-1}\right]$.

5. Darstellung der ACTH-Sequenzen

5.1. Sequenz 11-23: Synthese von Corticotropin-(11-23)-tridecapeptid

a) Veresterung von BOC-Tyr(OBzl) mit PEG_{20000}:

5.72 g BOC-Tyr(OBzl) (15 mMol) werden mit 2.03 g Hydroxybenzotriazol (221) (15 mMol) und 7.5 ml 2 M DCC-Lösung (15 mMol) in 30 ml DMF/CH_2Cl_2 bei 0° 30 Min. voraktiviert. 30 g PEG_{20000} (entsprechend ca. 3 mMol freier OH-Gruppen) werden in ca. 100 ml CH_2Cl_2 gelöst und die voraktivierte Aminosäure zur PEG-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wird zu einer etwa 30-prozentigen Lösung eingeengt und unter Zusatz von 2 ml Pyridin 2 Tage bei RT stehengelassen. Anschließend werden nochmals 7 mMol BOC-Tyr(OBzl) wie oben beschrieben aktiviert und der Reaktionslösung zugesetzt. Die Lösung wird weitere 10 Tage stehengelassen. Zur Isolierung wird die Lösung etwas eingeengt, erst mit Äther gefällt (30 Min. bei 0°), dann aus 300 ml Äthanol umkristallisiert, abzentrifugiert und ein zweites Mal aus CH_2Cl_2 mit Äther gefällt. Die dünnschichtchromatographische Reinheitsprüfung (Butanol/AcOH/H_2O 4:1:1) zeigt, daß die niedermolekulare Kupplungskomponente vollständig entfernt ist. Das Produkt wird bei ca. 0.1 Torr über P_4O_{10} getrocknet. Ausbeute: 29.5 g. Beladung: 0.55 mMol Tyr/10 g PEG; da bei der sauren Hydrolyse mit 6 N HCl 30-38% Tyr zerstört werden, wie durch mehrere Vergleichshydrolysen von BOC-Tyr(OBzl) nachgewiesen wurde, liegt die tatsächliche Beladung bei 0.8 - 0.89 mMol Tyr / 10 g PEG.

b) Synthesezyklus

Abspaltung der α-Aminoschutzgruppe:

Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe erfolgt in 10%-iger Lösung mit 1.2 N HCl/AcOH während 30 Min. bei RT. Danach

wird die Lösung eingeengt und aus den in Tab. 10 angegebenen Lösungsmitteln mit Äther gefällt. Nach 30 Min. Rühren im Eisbad wird abfiltriert und noch zwei Mal mit Äther gefällt. Anschließend wird das Produkt einige h bei 0.05 - 0.1 Torr bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Kupplung: Zur Kupplung von BOC-Val an PEG-Tyr(OBzl)-H werden 2.6 g BOC-Val (12 mMol) mit 1.62 g Hydroxybenzotriazol (12 mMol) (221) und 6 ml 2 M DCC-Lösung (12 mMol) 1 h bei 0° in 10 ml DMF/Methylenchlorid (1:1) voraktiviert.
28 g Peptidester werden in 100 ml CH_2Cl_2 gelöst und das voraktivierte Aminosäurederivat in das Reaktionsgefäß filtriert. Die Aminogruppen werden durch Zugabe von frisch hergestellter 1 M N-Methylmorpholinlösung (in CH_2Cl_2) neutralisiert (pH 6-7); bei sorgfältiger Entfernung der Essigsäure nach dem Abspaltungsschritt ist die Zugabe von 110% Base, bezogen auf die Aminogruppen, ausreichend. Die Reaktionslösung wird eingeengt und nach 4 h Reaktionszeit (RT) durch Ätherfällung unterbrochen. Dazu wird das Methylenchlorid erst abgedampft und anschließend aus Äthanol mit Äther gefällt. Zur vollständigen Entfernung der Kupplungskomponente wird ein zweites Mal aus CH_2Cl_2 mit Äther gefällt. Ausbeute: 28 g.
Auf vollständige Entfernung der aktivierten Aminosäure wird durch Dünnschichtchromatographie geprüft: Kieselgelplatten, Fließmittel: Butanol/AcOH/H_2O = 4:1:1, UV, Entwicklung mit Chlor-Tolidin-Reagenz; r_f Polymerpeptid = 0.

Umsatzbestimmung:
Der Umsatz der Kupplung wird durch den Ninhydrintest in Lösung kontrolliert (222). Die Empfindlichkeit der Reaktion liegt bei 0.1 µMol. Zum Nachweis von 1% freier Aminogruppen müssen deshalb 10 µMol (100 mg PEG_{2000}) eingewogen werden.
Ausführung: 10 µMol N-geschütztes Polymerpeptid werden in ein Reagenzglas eingewogen und mit je 1 ml Wasser und Stein-Moore Reagenz (222) versetzt und 20 Min. bei 80° gehalten. Das Ausbleiben einer Farbreaktion weist auf einen über 98-99%

liegenden Umsatz hin. (Eine entstandene Färbung läßt sich mit denjenigen von analog hergestellten Standardlösungen vergleichen und kolorimetrisch oder photometrisch bei 550 nm auswerten.)

Nach dem gleichen Synthesezyklus werden folgende Aminosäurederivate nacheinander umgesetzt: α-BOC-ε-Z-Lys, α-BOC-Pro, α-BOC-Arg.HCl, α-BOC-Gly, α-BOC-Val (vgl. Tab. 21). Von der obigen Vorschrift abweichende Reaktionsbedingungen sind für die einzelnen Stufen in Tab. 21 aufgeführt.

Bei den beiden Kupplungen von α-BOC-Arg (Tab. 21: Stufen 5 und 6) wird das N-ungeschützte PEG-Peptid aus Löslichkeitsgründen in reinem DMF gelöst; bei den folgenden Kupplungen wird die zu kuppelnde N-ungeschützte Komponente in DMF/CH_2Cl_2-Mischungen vom Verhältnis 1:1 bei den Stufen 7-10, bzw. 3:1 bei den Stufen 11 und 12 gelöst.

Die Ausbeute an geschütztem, PEG-gebundenem Tridekapeptid beträgt 9.7 g; 7.6 g wurden während der Synthese als Proben entnommen und 1.6 g wurden für Umsatztests eingesetzt.

Das Produkt besitzt folgende Aminosäurezusammensetzung:

	Tyr*	Val	Lys	Pro	Arg**	Gly
gef.	0.62	2.92	4.4	2.0	1.66	1.0
ber.	1	3	4	2	2	1

* 30-40% Tyr werden bei der sauren Hydrolyse zerstört
** ca. 15% Arg werden bei der sauren Hydrolyse zerstört (bestimmt durch Hydrolyse und Aminosäureanalyse eingewogener Proben von BOC-Tyr und BOC-Arg.HCl).

Bei der Beladungsbestimmung werden bei 11.56 mg Einwaage von PEG-Peptid (≙ 0.92 µMol) in der Aminosäureanalyse 0.61 µMol Gly und 1.21 µMol Pro gefunden, was einer Beladung von 66% entspricht.

	Kupplung	Ü.	R.z. (h)	Fällungen n. Kuppl.	Abspalt.	Fällungen n. Abspalt.
1	$Tyr^{23} \leftarrow Val^{22}$	4	15	EtOH/Äther***; CH_2Cl_2/Äther	1.2 N HCl/AcOH	3 x CH_2Cl_2/Äther
2	$Val^{22} \leftarrow Lys^{21}$	"	3	2 x DMF/Äther**	"	3 x EtOH/Äther***
3	$Lys^{21} \leftarrow Val^{20}$	"	20*	2 x CH_2Cl_2/Äther	"	"
4	$Val^{20} \leftarrow Pro^{19}$	"	12.5	2 x EtOH/Äther***	"	"
5	$Pro^{19} \leftarrow Arg^{18}$	"	18	"	"	"
6	$Arg^{18} \leftarrow Arg^{17}$	"	19	"	"	3 x DMF/Äther**
7	$Arg^{17} \leftarrow Lys^{16}$	"	5	2 x DMF/Äther**	"	"
8	$Lys^{16} \leftarrow Lys^{15}$	"	14	"	"	"
9	$Lys^{15} \leftarrow Gly^{14}$	"	2	2 x DMF+CH_2Cl_2/Äther**	"	"
10	$Gly^{14} \leftarrow Val^{13}$	"	24	DMF/Äther**; EtOH/Äther***	"	3 x EtOH/Äther***
11	$Val^{13} \leftarrow Pro^{12}$	"	5	2 x EtOH/Äther***	"	"
12	$Pro^{12} \leftarrow Lys^{11}$	"	14	"	"	"

Abkürzungen: Ü. = Überschuß
R.z. = Reaktionszeit

* Nachkupplung mit 2.3 mMol aktiviertem BOC-Val während 18 h

** zur Vervollständigung der Fällung wird 1 h im Eisbad stehen gelassen

*** zur Vervollständigung der Fällung wird 2-4 h im Eisbad stehen gelassen.

Tab. 21: Kupplungsbedingungen bei der Synthese von PEG-gebundenem Corticotropin-(11-23)-tridekapeptid

Zur dünnschichtchromatographischen Reinheitsprüfung wird eine Probe des Peptids alkalisch vom Träger abgespalten: 40 mg werden in 0.5 ml Dioxan-1 N KOH (1:1) aufgenommen (2 h bei 25-30°) und anschließend auf Kieselgel in Butanol/AcOH/H_2O (3:1:1) chromatographiert. Nach Entwicklung mit Ninhydrin und Chlor-Tolidinreagenz zeigt sich das Produkt als einheitlicher Chlor-Tolidin-positiver Fleck mit einem r_f = 0.64.

Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen:

Zur Abspaltung der O-Benzylschutzgruppe von Tyr^{23} und ε-Z-Schutzgruppen der Lysinreste (Pos. 21, 16, 15, 11) durch Hydrogenolyse werden 3 g vollgeschütztes PEG-Tridekapeptid in 70 ml Dioxan und 10 ml H_2O gelöst und die Lösung durch Zugabe einiger Tropfen AcOH auf pH 6 gebracht. Nach Zugabe von Pd-Mohr wird bis zur Beendigung der H_2-Aufnahme hydriert (19 h). Es wird vom Katalysator abfiltriert, das Dioxan abgedampft und das Produkt lyophilisiert. Ausbeute 2.9 g.

5.2. Sequenz 1-10: Synthese von [Val^4] Corticotropin-(1-10)-decapeptid und [Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4] Corticotropin-(1-10)-decapeptid

a) Veresterung von BOC-Gly mit PEG_{10000}:

20 g PEG, Mol.-Gew. 10^4, werden nach der in Kap. V.3. angegebenen Vorschrift verestert.
Veresterungsgrad nach Aminosäureanalyse: 0.15 mMol Gly/g PEG ≙ 0.75 mMol Gly/5 g PEG ≙ 100% d.Th. (bezogen auf exp. bestimmte OH-Gruppenkapazität).

b) Synthesezyklus:

Acidolytische Abspaltung der BOC-Gruppe

Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe erfolgt wie in Kap. V. 5.1.b) beschrieben mit dem Unterschied, daß nach Einführung

von Trp der Abspaltungslösung Anisol (5%) und Mercaptoäthanol (5%) zugesetzt werden und auf weitgehenden Ausschluß von Sauerstoff geachtet wird.

Hydrogenolytische Abspaltung der Z-Gruppe

Das geschützte Peptidderivat wird in MeOH gelöst (ca. 10%-ige Lösung), die Lösung mit HCl auf pH 4 gebracht und nach Zugabe von Pd-Schwarz mit H_2 hydriert, bis die H_2-Aufnahme beendet ist (bei Z_3-Arg nach 24 h). Dann wird vom Katalysator abfiltriert, die Lösungsmittel abgezogen und das Produkt aus CH_2Cl_2 mit Äther gefällt.

Kupplung:

Zur Kupplung von BOC-Trp an PEG-Gly-H werden 3.04 g BOC-Trp (10 mMol) mit 5 ml 2 M DCC-Lösung (10 mMol) 1 h bei 0° in CH_2Cl_2/DMF voraktiviert.

17 g Peptidester werden in CH_2Cl_2 gelöst und die Kupplung wie in Kap. V.5.1.b) beschrieben durchgeführt. Ausbeute: 16.8 g.

Umsatzbestimmung:

Der Umsatz der Kupplung wird durch den Fluramtest auf DC-Platten kontrolliert (s. Kap. V.2.1.).
Nach dem gleichen Synthesezyklus werden folgende Aminosäurederivate nacheinander umgesetzt: Z-Arg(Z_2), α-BOC-Phe, Di-BOC-His, α-BOC-Glu(γ-Bzl), α-BOC-Val, α-BOC-Ser(OBzl), α-BOC-Tyr(OBzl), bzw. α-BOC-Ala und α-BOC-Pro (vgl. Tab. 22). Nach der Stufe 6 wird der Ansatz halbiert; an einen Teil des Hexapeptids wird die Sequenz Ser(OBzl)-Tyr (OBzl)-Ser(OBzl)-BOC stufenweise angekuppelt, an den anderen Teil der Sequenz Ala-Ala-Pro-BOC.Arg^8 wird als Tri(Z)-Derivat eingesetzt. Die Entfernung der Z-Schutzgruppe erfolgt wie oben beschrieben durch Hydrogenolyse mit Pd-Mohr als Katalysator.

	Kupplung	Ü.	R.z. (h)	Fällungen n. Kuppl.	Abspalt.	Fällungen n. Abspalt.
1	Gly ← Trp	3	1.5	3 x EtOH/Äther^{+}	1.2 N HCl/AcOH*	3xCH_2Cl_2 + DMF/Äther^{+}
2	Trp ← Arg	"	5**	3 x DMF/Äther^{+}	H_2/Pd	1 x CH_2Cl_2/Äther
3	Arg ← Phe	"	3**	3 x CH_2Cl_2 + DMF/Äther^{+}	1.2 N HCl/AcOH*	3 x CH_2Cl_2/Äther
4	Phe ← His	"	18**	2 x CH_2Cl_2/Äther; MeOH^{++}	"	3 x CH_2Cl_2 + DMF/Äther
5	His ← Glu	"	14	2 x CH_2Cl_2 + DMF/Äther	"	"
6	Glu ← Val	"	16	2 x CH_2Cl_2 + DMF/Äther; MeOH^{++}	"	"
7	Val ← Ser	"	16	3 x CH_2Cl_2 + DMF/Äther	"	"
8	Ser ← Tyr	"	16	2 x CH_2Cl_2 + DMF/Äther; MeOH^{++}	"	"
9	Tyr ← Ser	"	16	2 x CH_2Cl_2 + DMF/Äther; MeOH^{++}	"	"
7'	Val ← Ala	"	16	2 x CH_2Cl_2/Äther	"	"
8'	Ala ← Ala	"	16	2 x CH_2Cl_2 + DMF/Äther	"	"
9'	Ala ← Pro	"	16	2 x CH_2Cl_2 + DMF/Äther; MeOH^{++}	"	

Abkürzungen: Ü. = Überschuß
R.z. = Reaktionszeit

* mit Zusatz von 5% Anisol und 5% Mercaptoäthanol
** mit Zwischenfällung
$^{+}$ 2-4 h Eisbad
$^{++}$ 6-12 h Eisbad

Tab. 22: Kupplungsbedingungen bei der Synthese von PEG-gebundenem [Val^4] Corticotropin-(1-10)-dekapeptid und [Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4] Corticotropin-(1-10)-dekapeptid

Die Ausbeute an geschütztem PEG-gebundenen [Val^4] Corticotropin-(1-10)-decapeptid beträgt 1.5 g, an [Pro^1, Ala^2, Ala^3, Val^4] Corticotropin-(1-10)-decapeptid 1.4 g; es wurden in jeder Stufe Proben von 200-500 mg entnommen.

Die Produkte besitzen folgende Aminosäurezusammensetzung:

	Gly	Trp	Arg*	Phe	His	Glu	Val	Ser	Tyr**
gef.	1.0	0.91	0.79	0.98	0.92	1.02	0.95	1.65	0.71
ber.	1	1	1	1	1	1	1	2	1

	Gly	Trp	Arg*	Phe	His	Glu	Val	Ala	Pro
gef.	1.0	0.94	0.81	1.01	0.90	0.97	0.92	1.92	0.96
ber.	1	1	1	1	1	1	1	2	1

* s. Seite 160

** s. Seite 160

Bei der Beladungsbestimmung des Val^4-Dekapeptids wurde eine Beladung von 0.12 mMol Peptid (bezogen auf Gly)/g PEG-Peptid gefunden, beim Pro, Ala, Ala-Analogen eine Beladung von 0.11 mMol Peptid (bezogen auf Gly) /g PEG-Peptid.

Zur dünnschichtchromatographischen Reinheitsprüfung wird eine Probe des Peptids wie unter V.5.1. beschrieben alkalisch vom Träger abgespalten und auf Kieselgel chromatographiert. Beide Dekapeptide erweisen sich als dünnschichtchromatographisch einheitlich.

Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen:

Zur Abspaltung der O-Benzylschutzgruppe von Ser und Tyr, sowie des γ-Benzylesters von Glu durch Hydrogenolyse werden 0.7 g des N-BOC-geschützten [Val^4] Corticotropin-(1-10)-dekapeptid in einer Mischung aus 40 ml Eisessig und 10 ml Dioxan gelöst. Nach Zugabe von Pd-Schwamm wird 72 h, bis zur Beendigung der H_2-Aufnahme hydriert. Es wird vom

Katalysator abzentrifugiert, engeengt, und nach Zugabe von wenig CH_2Cl_2 mit Äther gefällt. Zur weiteren Reinigung wird noch 2 Mal aus CH_2Cl_2/DMF mit Äther gefällt. Ausbeute: 0.4 g.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Konformationsstudien an Oligopeptiden und an den ACTH-Sequenzen 1-10 bzw. 11-23 durchgeführt. Dabei wurde der Zusammenhang zwischen Primärsequenz, Kettenlänge, Solvatation, Schutzgruppen und der Konformation untersucht, wobei sowohl spektroskopische Untersuchungsmethoden, insbesondere CD-Messungen, als auch Berechnungen zur Vorhersage von Sekundärstrukturbereichen herangezogen wurden. Die Synthese der Peptidsequenzen erfolgte stufenweise nach der Liquid-Phase-Methode.

Die Konformationsuntersuchungen wurden erstmals direkt an Polyäthylenglykol-gebundenen Peptiden durchgeführt. Die Anwesenheit der makromolekularen Estergruppe am C-Terminus des Peptids wirkte sich bei allen untersuchten Beispielen nicht störend auf die Konformation des Peptids aus. Selbst Peptide mit ausgeprägter Tendenz zur Bildung intermolekularer ß-Strukturen zeigten keinerlei Unterschiede im CD-Spektrum gegenüber ihren niedermolekularen Analogen. Es wurde gezeigt, daß neben der Messung des CD auch andere spektroskopische Methoden zur Konformationsuntersuchung wie z.B. NMR-, IR- und UV-Spektroskopie direkt auf PEG-Peptide angewandt werden können.
Der sich daraus ergebende Vorteil wurde an mehreren Beispielen aufgezeigt: So reicht die solubilisierende Wirkung von PEG, Mol.-Gew. 6.10^3 bzw. 2.10^4 aus, um die unlöslichen Oligomere $(L\text{-Ala})_{10}$, $(L\text{-Val})_8$ und $(L\text{-Ile})_8$ der Konformationsuntersuchung in organischen Lösungsmitteln und in Wasser zuzuführen. Sämtliche Oligomere besitzen ab einer Kettenlänge von 7 Aminosäureresten ß-Struktur, deren Stabilität in der Reihenfolge Ala < Val < Ile zunimmt.
Das erstmals untersuchte N-ungeschützte Dekaalanin liegt in Übereinstimmung mit theoretischen Vorhersagen in der ß-Konformation vor.

Der Synthesezyklus der LPM wurde bei der Synthese der hydrophoben Oligomerreihen in einigen Punkten modifiziert. Daneben wurde die Kinetik der Veresterungsreaktion untersucht und eine neue Methode zur exakten Bestimmung der Hydroxylgruppenkapazität von PEG entwickelt.

Die ACTH-Sequenzen 1-10 bzw. 11-23 wurden in geschützter und ungeschützter Form als PEG-Ester durch CD-Messung in organischem Medium und in Wasser untersucht. Für die N-terminale Sequenz ergibt sich ein Helixgehalt von ca. 10% in Trifluoräthanol, in Wasser findet ein Übergang zu einer ß-Struktur statt. Werden die drei N-terminalen Aminosäurereste der ACTH-Sequenz 1-10 durch die starken Helixbildner Pro^1-Ala-Ala^3 ersetzt, erhöht sich der Helixgehalt gegenüber der ursprünglichen Sequenz, wobei die starke Helix induzierende Wirkung des N-terminalen Prolins ausreicht, um die Helixstruktur auch in Wasser zu stabilisieren. Für die Sequenz 11-23 wird in geschützter Form ein Helixgehalt von 30% gefunden, während das ungeschützte, stark basische Peptid nur wenig Sekundärstruktur aufweist.

Die experimentellen CD-Untersuchungen werden durch die hier angewandten Vorhersagemethoden von Sekundärstrukturbereichen weitgehend gestützt. Sowohl die empirische Methode von Chou und Fasman als auch das wesentlich aufwendigere statistisch-mechanische "Dreizustandsmodell" von Tanaka und Scheraga ergeben eine "random coil"-Struktur für das Segment 11-23 und eine α-Helixstruktur im Bereich 2-9. Ebenso werden die Stabilitäten der ß-Strukturen der untersuchten Oligomere richtig vorhergesagt. Basierend auf den theoretischen und experimentellen Untersuchungen wurde für die Konformation des ACTH folgendes Modell vorgeschlagen: Das Segment 2-9 besitzt α-Helixstruktur, die Bereiche 18-24 bzw. 31-39 liegen in ausgestreckter Konformation vor, und das Segment 14-17 bildet eine Faltstelle ("ß turn"); die übrigen Bereiche weisen ungeordnete Struktur auf.

Eine weitere theoretische Untersuchung wurde über den Orientierungsfaktor $\langle \varkappa^2 \rangle$ durchgeführt, der bei Distanzmessungen zwischen Chromophoren mit Hilfe der Fluoreszenzemissionsspektroskopie eine Rolle spielt. Dabei wurden semiempirische Potentialfunktionen zur Ermittlung von Konformationsenergien verschiedener Aminosäurereste angewandt. Monte-Carlo Berechnungen ergaben, daß die bisherige Annahme einer Zufallsorientierung von Donor- und Akzeptorchromophor im Peptidverband unrealistisch ist und zu beträchtlichen Fehlern bei Distanzbestimmungen führen kann.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1) C.B.Anfinsen, Science 181, 223 (1973)

2) C.B.Anfinsen und H.A.Scheraga, Adv.in Protein Chem. 1975, S.205

3) H.Scheraga, Adv.Phys.Org.Chem. 6, 103 (1968)

4) G.D.Fasman, "Poly-α-Amino Acids", M.Dekker, Inc., New York 1967

5) "Peptides, Polypeptides and Proteins", Proc.of the Rehovot Symp., J.Wiley & Sons, New York 1974

6) H.A.Scheraga, Chem.Reviews 71, 195 (1971)

7) D.Poland and H.A.Scheraga, "Theory of Helix-Coil Transitions in Biopolymers", Academic Press, New York 1970

8) A.J.Hopfinger, "Conformational Properties of Macromolecules", Academic Press, New York 1973

9) "Conformation of Peptides and Proteins", Europ.Pept.Symp. 1973, Israel

10) P.J.Flory, "Statistical Mechanics of Chain Molecules", Interscience, New York 1969

11) S.S.Zimmerman und H.A.Scheraga, in "Peptides", Proc.4th Amer. Peptide Symp., Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor 1975, S. 263

12) H.A.Scheraga, Pure and Appl.Chem. 36, 1 (1973)

13) A.Burgess und H.A.Scheraga, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 72, 1221 (1975)

14) M.Mutter, H.Hagenmaier und E.Bayer, Angew.Chem.83, 883 (1971)

15) E.Bayer und M.Mutter, Nature 237, 512 (1972)

16) M.Mutter, Dissertation Univ. Tübingen 1972

17) M.Mutter und E.Bayer, Angew.Chem.86, 101 (1974); Angew.Chem., Int.Ed.Engl. 13, 88 (1974)

18) P.Y.Chou und G.D.Fasman, Biochemistry 13, 211 (1974); ibid. 13, 222 (1974)

19) P.Y.Chou und G.D.Fasman, Biochemistry 14, 196 (1975)

20) P.Y.Chou und G.D.Fasman, in "Peptides", Proc.5th Amer.Peptide Symp., San Diego 1977, im Druck

21) S. Tanaka und H.A.Scheraga, Macromolecules 9, 142 (1976)

22) S.Tanaka und H.A.Scheraga, Macromolecules 9, 159 (1976)

23) S.Tanaka und H.A.Scheraga, Macromolecules 9, 168 (1976)

24) S.Tanaka und H.A.Scheraga, Macromolecules 10, 9 (1977); ibid. 10, 305 (1977)

25) M.Bodanszky und M.A.Ondetti, "Peptide Synthesis", Interscience, New York 1966

26) M.Bodanszky in B.Weinstein: "Peptides, Chemistry and Biochemistry", M.Dekker, New York 1970, S. 1

27) E.Wünsch, Angew.Chem.83, 773 (1971)

28) R.Schwyzer und H.Kappeler, Helv.Chim.Acta 46, 1550 (1963)

29) E.Schröder und K.Lübke, "The Peptides", Academic Press, New York 1965, Vol.I

30) R.B.Merrifield, J.Am.Chem.Soc.85, 2149 (1963)

31) J.M.Stewart und J.D.Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H.Freeman and Company, San Francisco 1969

32) R.C.Sheppard, in "Peptides 1971", S.111, North Holland Publ., Amsterdam 1972

33) A.Marglin und R.B.Merrifield, Ann.Rev.Biochem.39, 841 (1970)

34) J.Meienhofer, Chem.Technol., 1973, 242

35) B.Erickson und R.B.Merrifield, in "The Proteins", 3rd Ed., Hrsg. H.Neurath und R.L.Hill, Acad.Press, New York 1976, S. 255

36) M.Mutter, R.Uhmann und E.Bayer, Liebigs Ann.Chem., 1975, 901

39) M.Mutter, Habilitationsschrift, Univ. Tübingen 1976

38) M.M.Shemyakin, Y.A.Ovchinnikov, A.A.Kiriushkin und I.V.Kozhevnikova, Tetrahedron Lett., 1965, 2323

39) R.H.Andreatta und H.Rink, Helv.Chim.Acta 56, 1205 (1973)

40) M.Fridkin, A.Patchornik und E.Katchalski, J.Am.Chem.Soc.88, 3164 (1966); J.Am.Chem.Soc. 90, 2953 (1968)

41) R.L.Letsinger und M.J.Kornet, J.Am.Chem.Soc. 85, 305 (1963)

42) R.L.Letsinger, M.J.Kornet, V.Mahadevan und D.M.Jerina, J.Am.Chem.Soc. 86, 5163 (1964)

43) H.Frank, H.Hagenmaier und E.Bayer, in "Peptides", Proc.5th Amer. Peptide Symp., San Diego1977, im Druck

44) H.Frank und H.Hagenmaier, Experimentia31, 131 (1975)

45) H.Frank. H.Meyer und H.Hagenmaier, in "Peptides", Proc.4th Amer. Peptide Symp., Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor 1975, S. 439

46) G.Heusel, G.Bovermann, W.Göhring und G.Jung, Angew.Chem.89, 681 (1977)

47) E.Bayer, H.Eckstein, K.Hägele, W.A.König, W.Brüning und H.Hagenmaier, J.Am.Chem.Soc. 92, 1735 (1970)

48) E.Bayer in B.Weinstein: "Peptides, Chemistry and Biochemistry", M.Dekker, New York 1970

49) H.Zahn, T. Okuda und Y.Shimonishi, Proc.8th Europ.Peptide Sympos., Nordwijk, September 1966, S. 108, North Holland Publ., Amsterdam 1967

50) E.Bayer, P.Hunziker, M.Mutter, R.Sievers und R.Uhmann, J.Am.Chem. Soc. 94, 265 (1972)

51) R.Leberman, J.Biol.Chem. 5, 23 (1971)

52) E.Bayer in "Chemistry and Biochemistry of Peptides", Hrsg. B.Weinstein, M.Dekker, New York 1970

53) H.Morawetz, in "Peptides", Proc.4th Amer.Peptide Symp., Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor 1975, S. 385

54) W.S.Hancock, J.Org.Chem. 38, 774 (1973)

55) P.N.Lewis, F.A.Momany und H.A.Scheraga, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 68, 2293 (1971)

56) E.Bayer, M.Mutter, R.Uhmann, J.Polster und H.Mauser, J.Am.Chem. Soc.96, 7333 (1971)

57) E.Bayer, M.Mutter, J.Polster und R.Uhmann, in "Peptides 1974", J.Wiley & Sons, New York, S.129

58) Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", Bd. 15, Teil 1, 1974

59) Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", Bd.15, Teil 2, 1974

60) J.P.Greenstein und M.Winitz, "Chemistry of the Amino Acids", J.Wiley and Sons, New York 1961

61) R.Schwyzer und P.Sieber, Helv.Chim.Acta 49, 134 (1966)

62) St.Guttmann, J.Pless, E.Sandrin, P.A.Jaquenoud, H.Bossert und M.Willems, Helv.Chim.Acta 59, 1155 (1968)

63) E.Wünsch, Z.Naturforsch. 22b, 1269 (1967)

64) K.Geckeler, Dissertation Univ.Tübingen 1973

65) E.Bayer und K.Geckeler, Liebigs Ann.Chem. 1974, 1671

66) E.Bayer, I.Gatfield, H.Mutter und M.Mutter, Tetrahedron, im Druck

67) H.Tadokoro, Y.Chatani, T.Yoshihara, S.Tahara und S.Murahashi, Makromol.Chem.73, 109 (1964)

68) Katalog "Polyglykole Hoechst", Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt

69) J.J.Maher, M.E.Furey und L.J.Greenberg, Tetrahedron Lett.1971, 27

70) A.Losse, Tetrahedron Lett.1971, 4989

71) V.Gut und J.Rudinger, Proc.9th Europ.Peptide Symp., North Holland Publ.Comp., Amsterdam 1968, S.185

72) P.J.Flory, "Principles of Polymer Chemistry", Cornell University Press, Ithaca and London, 1953

73) H.Neidlinger, Dissertation Univ.Mainz 1975

74) E.Bayer und M.Mutter, Chem.Ber.107, 1344 (1974)

75) E.Bayer, G.Holzer und M.Mutter, in "Peptides", 1975, S.425

76) U.Heitmann, Dissertation Univ.Tübingen, im Gange

77) P.J.Flory, J.Am.Chem.Soc. 62, 1561 (1940)

78) W.Jäger, Dissertation Univ.Tübingen 1975

79) I.Gatfield, Dissertation Univ.Tübingen 1975

80) G.Holzbach, Dissertation Univ.Tübingen 1977

81) S.R.Palit und A.R.Mukherjee, J.Polymer Sci.58, 1243 (1962)

82) STI 300 1-968 (1972); ASTM D 1638 (1975)

83) D.W.Emerson, W.K.Langdon und J.Niu, Macromolecules 9, 667 (1976)

84) L.Rand, B.Thir, S.L.Reegen und K.C.Frisch, J.Appl.Pol.Sci.9, 1787 (1965)

85) K.C.Frisch, S.L.Reegen und B.Thir, J.Pol.Sci., C 16, 2191 (1967)

86) H.Morawetz, "Macromolecules in Solution", J.Wiley and Sons, New York 1974

87) M.Rinaudo und A.Domard, J.Am.Chem.Soc. 98, 6360 (1976)

88) M.Rinaudo und A.Domard, Macromolecules 10, 720 (1977)

89) M.Goodman, A.S.Verdini, C.Toniolo, W.D.Phillips und F.A.Bovey, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 64, 444 (1969)

90) W.B.Gratzer und P.Doty, J.Am.Chem.Soc. 85, 1193 (1963)

91) R.T.Ingwall, H.A.Scheraga, N.Berger und E.Katchalski, Biopolymers 6, 331 (1968)

92) M.Goodman, F.Naider und P.Rupp, Bioorg.Chem.1, 310 (1971)

93) M.Goodman, P.Rupp und F.Naider, Bioorg.Chem.1, 294 (1971)

94) M.Mutter, H.Mutter, R.Uhmann und E.Bayer, Biopolymers 15, 917 (1976)

95) H.Hagenmaier und H.Frank, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 159 (1972)

96) H.Hagenmaier und M.Mutter, Tetrahedron Lett.9, 767 (1974)

97) C.Toniolo und G.M.Bonora, Makromol.Chem.176, 2547 (1975)

98) G.Nicholson, H.Frank und E.Bayer, unveröffentlicht

99) S.Udenfriend, S.Stein. P.Böhlein, W.Dairman, W.Leimgruber und M.Weigele, Science 178, 871 (1972)

100) C.Toniolo, Biopolymers 10, 1707 (1971)

101) M.Goodman, C.Toniolo und F.Naider in 5) S.308

102) W.F.White, J.Am.Chem.Soc. 75, 503 (1953)

103) P.H.Bell, J.Am.Chem.Soc. 76, 5565 (1954)

104) C.H.Li, I.I.Gschwind, A.L.Levy, J.I.Harris, J.S.Dixon, N.G.Pon und J.O.Porath, Nature 173, 251 (1954)

105) T.H.Lee, A.B.Lerner und V.Buettner-Janusch, J.Am.Chem.Soc.81, 6084 (1959)

106) P.H.Bell, K.S.Howard, R.G.Shepherd, B.M.Finn und J.H.Meisenhelder, J.Am.Chem.Soc. 78, 5059 (1956)

107) R.D.Cole, C.H.Li, J.I.Harris und N.G.Pon, J.Biol.Chem.219, 903 (1956)

108) C.H.Li, Recent Progr.Hormone Res.18, 1 (1962)

109) R.A.Boissonnas, S.Guttmann, J.P.Waller und P.A.Jaquenoud, Experientia 12, 446 (1956)

110) K.Hofmann, N.Yanaihara,S.Lande und H.Yajima, J.Am.Chem.Soc.84, 4470 (1962)

111) C.H.Li, J.Meienhofer, E.Schnabel, D.Chung. T.B.Lo und J.Ramachandran, J.Am.Chem.Soc. 82, 5760 (1960)

112) C.H.Li, J.Meienhofer, E.Schnabel, D.Chung, T.B.Lo und J.Ramachandran, J.Am.Chem.Soc. 83, 4449 (1961)

113) R.Schwyzer und P.Sieber, Helv.Chim.Acta 49, 134 (1966)

114) R.Schwzyer und P.Sieber, Nature 199, 172 (1963)

115) B.Hemmasi, Dissertation Univ.of California, San Francisco 1971

116) R.Schwyzer, P.Schiller, J.-L.Fauchere, G.Karlaganis und G.-M.Pelican, in "Structure Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones", Excerpta Medica, Amsterdam 1971, S. 167

117) H.Edelhoch und R.E.Lippoldt, J.Biol.Chem.244, 3876 (1969)

118) K.Hägele, Dissertation Univ. Tübingen 1970

119) W.Woiwode, Dissertation Univ.Tübingen, 1977

120) F.A.Momany, R.F.McGuire, A.W.Burgess und H.A.Scheraga, J.Phys.Chem. 79, 2361 (1975)

121) M.Schiffer und A.B.Edmundson, Biophys.J.8, 29 (1968)

122) C.C.F.Blake, Progr.in Biophysics 25, 83 (1972)

123) J.C.Conrad, Dissertation, Stanford University 1973

124) G.Némethy und H.A.Scheraga, Biopolymers 3, 155 (1965)

125) N.Go, P.N.Lewis und H.A.Scheraga, Macromolecules 3, 628 (1970)

126) F.A.Momany, L.M.Carruthers und H.A.Scheraga, J.Phys.Chem. 78, 1621 (1974); ibid. S. 1595

127) K.H.Meyer und H.Mark, Ber. 61, 1932 (1928)

128) L.Pauling, R.B.Corey und H.R.Branson, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.37, 205 (1951)

129) L.Pauling und R.B.Corey, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.37, 729 (1951)

130) W.T.Astbury und H.J.Woods, Nature 127, 663 (1931)

131) A.E.Mirsky und L.Pauling, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.22, 439 (1936); L.Pauling, J.Am.Chem.Soc. 62, 2643 (1940)

132) W.Kauzmann, in "The Mechanism of Enzyme Action" (W.D.McElroy und B.Glass, eds.), Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954, S.70

133) W.Kauzmann, Advan.Protein Chem. 15, 1 (1959)

134) E.R.Blout und A.Asadourian, J.Am.Chem.Soc. 78, 955 (1956)

135) E.R.Blout, C.de Lozé, S.M.Bloom und G.D.Fasman, J.Am.Chem.Soc. 82, 3787 (1960)

136) E.R.Blout, in "Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins" (M.A.Stahmann, ed.), Univ.Wisconsin Press Madison, 1962, S.275

137) M.F.Perutz, J.C.Kendrew und H.C.Watson, J.Mol.Biol.13, 669 (1965)

138) J.C.Kendrew, Brookhaven Symp.Biol. 15, 216 (1962)

139) W.Moffitt, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 42, 731 (1956)

140) W.Moffitt und A.Moscowitz, J.Chem.Phys.30, 648 (1959)

141) G.Holzwarth und P.Doty, J.Am.Chem.Soc. 87, 218 (1965)

142) K.Rosenheck und P.Doty, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.41, 1775 (1961)

143) F.A.Bovey, "Polymer Conformation and Configuration", Academic Press, New York, 1969, S. 68

144) B.Zimm und J.Bragg, J.Chem.Phys.31, 526 (1959)

145) J.H.Gibbs und E.A.DiMarzio, J.Chem.Phys.28, 1247 (1958); Ibid., 30, 271 (1959)

146) S.Lifson und A.Roig, J.Chem.Phys. 34, 1963 (1961)

147) G.N.Ramachandran, C.Ramakrishnan und V.Sasisekharan, in "Aspects of Protein Structure" (G.N.Ramachandran, ed.), Academic Press, New York, 1963, S. 121

148) A.M.Liquori, J.Polymer Sci. C 12, 209 (1966)

149) R.A.Scott und H.A.Scheraga, J.Chem.Phys.45, 2091 (1966)

150) S.Lifson, J.Chem.Phys. 40, 3705 (1964)

151) M.Goodman und N.S.Choi, in "Peptides" (E.Bricas, ed.), North-Holland, Amsterdam, 1968, S.1

152) K.Albert, H.Mutter und E.Bayer, unveröffentlichte Ergebnisse

153) G.Jung, N.Dubischar, G.Irmscher, W.Mayr und R.Oekonomopulos, Chemiker-Zeitung 101, 196 (1977)

154) W.Kriech, Diplomarbeit, Univ.Tübingen 1975

155) H.E.Stanley, I.M.Asher, K.J.Rothschild, G.D.J.Phillies, E.B. Carew, R.Bansil und I.A.Michaels, in "Peptides", Proc.4th Amer. Peptide Sympos., Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor 1975, S.227

156) M.Mutter, Macromolecules, im Druck

157) W.Mayr, R.Oekonomopulos und G.Jung, Biopolymers, im Druck

158) B.Vollmert und H.Stutz, Angew.Makromol.Chem. 3, 182 (1968)

159) P.J.Flory in (72) , S. 495 ff.

160) R.G.Kirste, W.A.Kruse und J.Schelten, Makromol.Chem.162, 299 (1972)

161) R.G.Kirste, W.A.Kruse und K.Ibel, Polymer 16, 120 (1975)

162) V.I.Lim, J.Mol.Biol. 88, 873 (1974)

163) C.Toniolo und G.M.Bonora, Can.J.Chem. 54, 70 (1976)

164) K.D.Gibson und H.A.Scheraga, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.63, 9 (1969)

165) G.Schneider, Dissertation, Universität Tübingen 1970

166) C.Toniolo und G.M.Bonora, Makromol.Chem.175, 2203 (1974)

167) C.Toniolo, G.M.Bonora und A.Fontana, Int.J.Pept.Prot.Res.6, 371 (1974)

168) J.P.Lorenzi, persönliche Mitteilung

169) M.Goodman, N.Ueyama und F.Naider, Biopolymers 14,901 (1975)

170) C.Toniolo und G.M.Bonora, J.Pol.Sci.14, 515 (1976)

171) H.G.Zachmann, Fortschr.Hochpol.Forsch. 3, 581 (1964)

172) P.G.Squire und T.Bewley, Biochim.Biophys.Acta (1965), 109

173) S.N.Timasheff, H.Susi, R.Townend, L.Stevens, M.W.Gorbunoff und T.F.Kumowski, in "Conformation of Biopolymers" (Ed.G.M.Ramachandran), Academic Press New York, S.173

174) W.B.Gratzer, G.H.Beaven, H.W.E.Rattle und E.M.Bradbury, European J.Biochem.3, 276 (1968)

175) C.H.Li, Recent Progr.Hormone Res.18, 1 (1962)

176) L.C.Craig, J.D.Fisher und T.P.King, Biochemistry 4, 311 (1965)

177) A.Grinvald, E.Haas und I.Z.Steinberg, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 69, 2273 (1972)

178) J.Eisinger, Biochemistry 8, 3902 (1969)

179) R.E.Dale und J.Eisinger, Biopolymers 13, 1573 (1974)

180) V.J.Hruby, in "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins", (B.Weinstein, Hrsg.), M.Dekker Inc., New York, 1974 S.1

181 B.Jirgensons, "Optical Activity of Proteins and Other Macromolecules", Springer-Verlag, Berlin, 1973

182) G.M.Bonora und C.Toniolo, Biopolymers 13, 2179 (1974)

183) C.Toniolo und G.M.Bonora, in "Peptides", Proc.4th Amer.Peptide Symp., Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor 1975, S. 145

184) H.A.Scheraga, in "Peptides", Proc.5th Amer.Peptide Symp., San Diego, 1977, im Druck

185) E.Haas, M.Wilchek, E.Katchalski-Katzir und I.Z.Steinberg, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 72, 1807 (1975)

186) G.N.Ramachandran, C.Ramakrishnan und V.Saşisekharan, J.Mol.Biol.7, 95 (1963)

187) P.N.Lewis, F.A.Momany und H.A.Scheraga, Isr.J.Chem.11, 121 (1973)

188) D.W.Smits und E.H.Wiebenga, Acta Christ.6, 531 (1953)

189) G.D.Fasman und P.Y.Chou in (5) , S. 114

190) B.Robson und R.H.Pain, Biochem.J.141, 883 (1974)

191) K.Nagano, J.Mol.Biol.84, 337 (1974)

192) R.H.Conrad und L.Brand, Biochemistry 7, 77 (1968)

193) R.Bronson, "Matrix Methods", Academic Press, New York 1973

194) T.Miyazawa in (4) , S. 69

195) R.Guillard, M.Leclerc, A.Loffet, J.Leonis, B.Wilmet und A.Englert, Macromolecules 8, 134 (1975)

196) Th.Förster, Ann.Physik 2, 55 (1948)

197) J.Eisinger, B.Feuer und A.A.Lamola, Biochemistry 8, 3908 (1969)

198) Th.Förster, in "Modern Quantum Chemistry", Hrsg.O.Sinanoglŭ, Academic Press, New York 1966

199) S.A.Latt, H.T.Cheung und E.R.Blout, J.Am.Chem.Soc.87, 995 (1965)

200) L.Stryer und R.P.Haughland, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.58, 719 (1967)

201) ECEPP, Quantum Chemistry Program Exchange, Chem.Dep.Indiana University, Bloomington, Ind. 1975

202) K.Pitzer, Adv.Chem.Phys.2, 49 (1959)

203) D.A.Brant und P.J.Flory, J.Am.Chem.Soc. 87, 2791 (1965)

204) D.A.Brant, W.G.Miller und P.J.Flory, J.Mol.Biol.23, 47 (1967)

205) S.Mabrey und I.M.Klotz, Biochemistry 15, 234 (1976)

206) E.Schnabel, Liebigs Ann.Chem. 702, 188 (1967)

207) L.A.Carpino, J.Am.Chem.Soc.79, 4427 (1957)

208) C.H.Li, D.Yamashiro und S.Lemaire, Biochemistry 14, 954 (1975)

209) St.Guttmann und R.A.Boissonnas, Helv.Chim.Acta 41, 1852 (1958)

210) W.E.Hanby, S.G.Waley und J.Watson, J.Chem.Soc. (1950), 3239

211) E.R.Blout und R.H.Karlson, J.Am.Chem.Soc. 78, 944 (1956)

212) H.Eckstein, Dissertation, Univ.Tübingen 1970

213) E.Wünsch, G.Fries und A.Zwick, Chem.Ber. 91, 542 (1958)

214) K.Schlögel und H.Fabischowitz, Mh.Chem. 84, 950 (1953)

215) D.Yamashiro, J.Blake und C.H.Li, J.Am.Chem.Soc., , 2857 (1972)

216) L.Zervas, J.Am.Chem.Soc. 83, 3300 (1961)

217) E.Stahl, "Dünnschichtchromatographie", Springer-Verlag, Berlin 1967

218) C.J.Weber, J.Biol.Chem.86, 217 (1930)

219) "Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papierchromatographie", Fa.E.Merck, Darmstadt 1970

220) A.Felix und M.H.Jiminez, J.Chromatogr.89, 361 (1974)

221) W.König und R.Geiger, Chem.Ber.103, 788 (1970)

222) S.Moore, D.H.Spackman und W.H.Stein, Anal.Chem.30, 1185 (1958)

223) R.A.Pasternak, Acta Christ. 9, 341 (1956)

224) P.S.Song und W.E.Kurtin, J.Am.Chem.Soc. 91, 4892 (1969)

225) S.V.Konev, "Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids", Plenum Press, New York 1967, S.52

226) W.König und G.Nicholson, Anal.Chem. 47, 951 (1975)

227) W. Stein, Dissertation, Univ. Tübingen 1976

Lebenslauf

29.7.1946	Geburt in Basel/Schweiz
1953 - 1955	Besuch der Volksschule in Tübingen
1955 - 1957	Besuch der Volksschule in Reinach und Münchenstein b. Basel
1957 - 1965	Besuch des neusprachlichen Gymnasiums in Basel
1965	Matura
1965 - 1967	Chemiestudium an der Universität Basel
1967 - 1972	Biochemiestudium an der Universität Tübingen
1972 - 1973	Diplomarbeit bei Prof. Dr. W. Voelter
1973, Okt.	Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof.Dr.E. Bayer
1975 - 1976	Aufenthalt an der Stanford University (USA) im Arbeitskreis von Prof. Dr. P.J. Flory
1977, Juni	Ende der experimentellen Doktorarbeit

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren

E. Bayer, E. Bünning, H. Diekmann, H. Erlenmeyer, S. Fallab, P.J. Flory, H. Krüger, H. Mauser, H. Metzner, F.P. Möhres, K. Mörike, E. Müller, G. Opitz, W. Rüdorff, W. Schweizer, E. Stumpp, W. Voelter, G. Weitzel, U. Weser, H. Zähner.

lifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/64321